

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**DETERMINACIÓN DE *Salmonella* spp. EN HUEVOS FRESCOS DE  
GALLINA EN LOS PRINCIPALES MERCADOS DE LA CIUDAD DE  
QUITO**

Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar el Título  
de Médico Veterinario Zootecnista

JUAN PABLO ESTRADA AGUILA  
BYRON ANDRÉS VALENCIA BUSTAMANTE

TUTOR: Dr. Richar Rodríguez H., Ph.D.

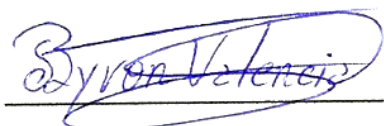
Quito, julio, 2012

## AUTORIZACIÓN DE LA AUTORÍA INTELECTUAL

Nosotros, Byron Andrés Valencia Bustamante y Juan Pablo Estrada Aguila en calidad de autores del trabajo de tesis realizada sobre "DETERMINACIÓN DE *Salmonella* spp. EN HUEVOS FRESCOS DE GALLINA EN LOS PRINCIPALES MERCADOS DE LA CIUDAD DE QUITO", por la presente autorizamos a la UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR, hacer uso de todos los contenidos que nos pertenecen o de parte de los que contiene esta obra, con fines estrictamente académicos o de investigación.

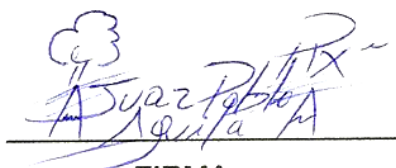
Los derechos que como autores nos corresponden, con excepción de la presente autorización, seguirán vigentes a nuestro favor, de conformidad con lo establecido en los artículos 5, 6, 8; 19 y demás pertinentes de la Ley de Propiedad Intelectual y su Reglamento.

Quito, a 26 de julio de 2012.



FIRMA

BYRON VALENCIA  
C.C. 171962264-7



FIRMA

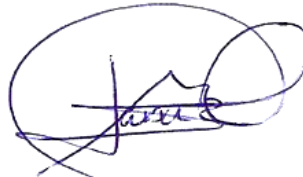
JUAN ESTRADA  
C.C. 020181401-9

## INFORME DE APROBACIÓN DEL TUTOR

En mi carácter de Tutor del Trabajo de Grado, presentado por los señores Juan Pablo Estrada Aguila y Byron Andrés Valencia Bustamante para optar el Título o Grado de Médico Veterinario Zootecnista, cuyo título es "Determinación de *Salmonella* spp. en huevos frescos de gallina en los principales mercados de la ciudad de Quito".

Considero que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la presentación pública y evaluación por parte del jurado examinador que se designe.

En la ciudad de Quito, a los 26 días del mes de julio del 2012.

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Richar Rodríguez', is written over a horizontal line.

Firma

Dr. Richar Rodríguez H., Ph.D.

Cd. N° 1712051786

## APROBACIÓN DEL TRABAJO/TRIBUNAL TÍTULO DEL TRABAJO DE GRADO

El Tribunal constituido por:

Dr. Polibio Villacís, Presidente del Tribunal, Dr. Javier Vargas, Primer Vocal Principal, Dra. Ana Luisa Cevallos, Segundo Vocal Principal, Dr. Eduardo Aragón, Biometrista y Dr. Rodrigo Egas, Vocal Suplente.

Luego de recepcionar la presentación del trabajo de grado previo a la obtención del Título de Médico Veterinario Zootecnista, presentado por los señores Juan Pablo Estrada Aguila y Byron Andrés Valencia Bustamante, con el título "Determinación de *Salmonella spp.* en huevos frescos de gallina en los principales mercados de la ciudad de Quito".

Ha emitido el siguiente veredicto: APROBADO.

26 de julio del 2012

Para constancia de lo actuado

(Firman)

Dr. Polibio Villacís  
PRESIDENTE DEL TRIBUNAL



---

Dr. Javier Vargas  
PRIMER VOCAL PRINCIPAL




---

Dra. Ana Luisa Cevallos  
SEGUNDO VOCAL PRINCIPAL



---

Dr. Eduardo Aragón  
BIOMETRISTA



---

Dr. Rodrigo Egas  
VOCAL SUPLENTE

---

## **DEDICATORIAS**

A mi Madre y Hermano

JUAN PABLO

A Dios por darme la oportunidad de vivir, amar, querer, experimentar, conocer y disfrutar.

A mis padres Byron y Flor y a mis hermanos Melany y David “regalos de Dios” quienes forman parte de mi vida, alegrías, tristezas y errores. A los cuales amo y respeto.

A mi novia Karla por darme su apoyo, su esfuerzo, su compañía, por sacrificarse para que cumpla mis metas, por darme su amor.

BYRON ANDRÉS

## **RECONOCIMIENTOS**

Si mis emociones fuesen un árbol, quiero agradecer a dos personas por alimentarlo y mantenerlo vivo: a mi madre, Alicia Aguila y a mi hermano, Rodrigo Estrada. Agradezco a mis tíos y tía, verdaderos escultores de mí ser; a mis amigos y amigas, por embeber el tiempo de un sabor agradable, y a todas aquellas personas que tienden actuar como energía para que todo avance. A nuestro profesor guía Dr. Richar Rodríguez, por brindarnos confianza y dirección; a mi compañera Karlita Vasco por su valiosa ayuda, y a mi compañero Andrés por su amigable trabajo. También quiero plasmar un sincero gracias a todas aquellas personas que estructuran y fundamentan, el Laboratorio de Bacteriología de la Universidad Central y el Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito.

Gracias a todos.

JUAN PABLO

# ÍNDICE GENERAL

	pp.
LISTADO DE TABLAS.....	ix
LISTADO DE FIGURAS.....	x
LISTADO DE ANEXOS.....	xi
RESUMEN .....	xii
ABSTRAC .....	xiii
 INTRODUCCIÓN .....	 1
 CAPÍTULO I	
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Generalidades (Salmonelosis).....	4
Etiología.....	4
Patogenia .....	7
Mecanismos de contaminación de los huevos con <i>Salmonella</i> .....	7
Diagnóstico.....	9
Signos y síntomas .....	12
Tratamiento .....	15
Prevención.....	15
Epidemiología.....	16
 CAPÍTULO II.....	 23
MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
Localización del área de estudio. ....	23
Materiales: .....	24
Métodos.....	25
 CAPÍTULO III.....	 34
RESULTADOS.....	34
 CAPÍTULO IV.....	 39
DISCUSIÓN .....	40

CAPÍTULO V.....	44
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	44
Conclusión.....	44
Recomendaciones.....	44
ANEXOS.....	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	62
BIBLIOGRAFÍA.....	62
NET-GRAFÍA.....	65
LISTADO DE ABREVIATURAS.....	68
GLOSARIO.....	71



## LISTADO DE TABLAS

1. pp.

1. Tabla 1. Test bioquímicos más utilizados en la diferenciación de <i>Salmonella</i> de otros miembros de la familia Enterobacteriaceae y la identificación de <i>Salmonella</i> serotipos Typhi y Paratyphi A <sup>a</sup> .....	12
2. Tabla 2. Estudio de <i>Salmonella</i> en diferentes tipos de carne .....	19
3. Tabla 3. Enfermedades debidas a <i>Salmonella</i> en la Provincia de Pichincha en el 2011 y entre enero y mayo de 2012.....	21
4. Tabla 4. Mercados seleccionados para el estudio.....	23
5. Tabla 5. Tabla de lectura para la revelación de resultados del API 20E.....	31
6. Tabla 6. Resultados de la pruebas bioquímicas preliminares del primer muestreo.....	35
7. Tabla 7. Resultados de la pruebas bioquímicas preliminares del segundo muestreo.....	35
8. Tabla 8. Resultados de las Pruebas Bioquímicas Confirmatorias (Galería API 20E) .....	36
9. Tabla 9. Número de expendios de huevos encontrados en los mercados de Quito, entre febrero y marzo del 2012. ....	54
10. Tabla 10. Datos de las encuestas realizadas a los expendedores de huevos de los mercados seleccionados para el estudio, febrero del 2012. ....	55
11. Tabla 11. Resultados de las siembras en el primer muestreo, en los medios SSA y XLD.....	60
12. Tabla 12. Resultados de las siembras en el segundo muestreo, en los medios SSA y XLD.....	61

## LISTADO DE FIGURAS

	pp.
1. Fig 1. Árbol filogenético del clado <i>Salmonella</i> .....	6
2. Fig 2. Dendograma de <i>Salmonella enterica</i> (Basado en la genómica del Blast) .....	6
3. Fig 3. Patogénesis de la contaminación del huevo por <i>Salmonella enteritidis</i> . .....	9
4. Fig 4. Alimentos implícitos en brotes de <i>Salmonella</i> en la UE, año 2008 ....	19
5. Fig 5. Casos y Tasas de Salmonelosis en el Ecuador entre 1990 y 2008 ...	20
6. Fig 6. Distribución mundial de especies de <i>Salmonella</i> en fuentes humanas y no humanas. ....	22
7. Fig 7. Esquema del estudio experimental .....	32
8. Fig 8. Flujograma del análisis microbiológico .....	32
9. Fig 9. Porcentaje de muestras sospechosas en el primer muestreo .....	34
10. Fig 10. Porcentaje de muestras sospechosas en el segundo muestreo .....	34
11. Fig 11. Bacterias provenientes de los huevos colectados en los mercados de Quito, identificadas por API 20E. ....	36
12. Fig 12. Lugares de Procedencia de los Huevos .....	37
13. Fig 13. Tiempo de almacenamiento de los huevos .....	38
14. Fig 14. Métodos de limpieza de los huevos .....	38
15. Fig 15. Destino de los huevos dañados o defectuosos .....	39
16. Fig 16. Otros productos que se comercializan en los sitios de venta de huevos .....	39
17. Fig 17. Número de expendios muestreados.....	54
18. Fig 18. Tipo de Venta de Huevos en los Expendios .....	58
19. Fig 19. Número de cubetas de huevos que se venden en los expendios ....	58
20. Fig 20. Granjas de Procedencia de los Huevos .....	59
21. Fig 21. Selección de los huevos.....	59

## LISTADO DE ANEXOS

	pp.
Anexo A. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1973:2011. Huevos Comerciales y Ovoproduitos. Requisitos Microbiológicos.....	46
Anexo B. Medios de Cultivo Utilizados .....	47
Anexo C. Encuestas. ....	53
Anexo D. Resultados de las siembras en el primer muestreo, en los medios SSA y XLD. ....	60
Anexo E. Resultados de las siembras en el segundo muestreo, en los medios SSA y XLD. ....	61

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**“Determinación de *Salmonella* spp. en huevos frescos de gallina en los principales mercados de la ciudad de Quito”.**

**Autores:** Juan Pablo Estrada Aguila, Byron Andrés Valencia Bustamante

**Tutor:** Dr. Richar Rodríguez H., Ph.D.

Julio, 2012.

## **RESUMEN**

En el Ecuador, la salmonelosis es una enfermedad de notificación obligatoria. A nivel mundial es una de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETAs) más importante, siendo los huevos una de las principales fuentes de la infección. El objetivo principal de este estudio fue determinar la presencia de *Salmonella* spp. en huevos frescos de gallina en los principales mercados de la ciudad de Quito. En total se analizaron 282 huevos agrupados en 94 muestras (cada muestra constituida por tres huevos). Se realizaron 2 recolecciones (de 47 muestras cada una), con un lapso de 30 días entre el inicial y el de replicación. Al cultivo bacteriológico, las colonias sugestivas de *Salmonella* fueron analizadas por pruebas bioquímicas para su tipificación. En ninguna de las muestras se confirmó la presencia de *Salmonella* spp., pero se evidenciaron bacterias entéricas y ambientales que pueden perjudicar la calidad del huevo e incluso producir problemas en salud pública como: *Pseudomona* spp., *Enterobacter cloacae*, *Pantoea* spp., *Providencia rettgeri*, *Proteus mirabilis*, *Aeromona* spp. y *Burkholderia cepacia*. Sin embargo, este estudio no descarta la presencia de *Salmonella* spp. en huevos comercializados en la ciudad de Quito.

**PALABRAS CLAVES:** SALMONELLA, HUEVOS, MERCADOS, BACTERIOLOGÍA, ALIMENTOS.

**“The determination of *Salmonella* spp. in fresh hen eggs in the principal markets of Quito”.**

**ABSTRAC**

In Ecuador, salmonellosis is a disease that requires public notification. It is globally known to be one of the most important foodborne diseases, with eggs as one of the primary sources of infection. The objective of this study was to determine the presence of *Salmonella* spp. in fresh hen eggs in the principal markets of Quito. A total of 282 eggs were analyzed in 94 pooled samples (each sample consisting of 3 eggs). There were two samplings (each one of 47 samples), with a span of 30 days between the initial and the replication ones. After bacterially cultured, the suggestive colonies of *Salmonella* were analyzed using biochemical tests for bacterial classification. No samples confirmed the presence of *Salmonella* spp. but there was confirmed the presence of enteric and environmental bacteria that can damage egg quality and even cause problems in public health such as: *Pseudomonas* spp., *Enterobacter cloacae*, *Pantoea* spp., *Providencia rettgeri*, *Proteus mirabilis*, *Aeromonas* spp. and *Burkholderia cepacia*. However, this research does not rule out the presence of *Salmonella* spp. in eggs sold in the city of Quito.

**KEYWORDS:** SALMONELLA, EGGS, MARKETS, BACTERIOLOGY, FOOD.

## INTRODUCCIÓN

La salmonelosis humana es una enfermedad zoonótica que genera cuantiosas pérdidas económicas a nivel mundial por su elevada morbilidad y mortalidad. En la Unión Europea la salmonelosis ha sido una de las ETAs más frecuentes constituyendo el 31% de todos los brotes (ECDC, 2011). Mientras que en Estados Unidos la *Salmonella* fue la segunda causa más común de las ETAs con 1.027.561 casos (11%) siendo la primera causa de hospitalizaciones y muertes (CDC, 2011).

En el Ecuador, las enfermedades transmitidas por agua y alimentos (ETAs) están entre las diez primeras enfermedades de notificación obligatoria, siendo la salmonelosis una de las más importantes causas de brotes (MSP, 2009). En el Ecuador, en el año 1990 se reportaron 9.908 casos de salmonelosis; en el 2001 esta cifra aumentó bruscamente a 18.772, periodo desde el cual el número ha ido disminuyendo paulatinamente con 3.286 casos en el 2008 (MSP/EPI 2, 2008).

Los huevos constituyen una fuente de proteína de origen animal de menor precio y comprobado valor nutritivo (Panaftosa, 2005), por lo que forman parte importante de la dieta alimenticia de la mayoría de los ecuatorianos, cuyo consumo per cápita anual ha aumentado de 121 a 140 huevos por ecuatoriano en menos de dos años, con un promedio de 12 huevos al mes (Conave, 2011).

Del 77% al 82% de los brotes de *Salmonella enteritidis* se han asociado a huevos con cáscara o alimentos a base de huevos (FAO/OMS, 2005). La *Salmonella enteritidis* ha desarrollado una excepcional capacidad para colonizar el tejido ovárico de las gallinas y estar presente en el contenido de los huevos con cáscara intacta facilitando su transmisión a los seres humanos (FAO/OMS, 2005).

En nuestro medio, varios alimentos (ovoproductos) son preparados en

base a huevos crudos, tales como: mayonesa, salsas, ensaladas, rompopo, jugos, espumilla, helados caseros, cremas para pastelería, medicina artesanal, entre otros. Igualmente se acostumbra ingerir huevos crudos o mal cocidos (Observaciones personales).

En el 2011, se reportaron en la provincia de Pichincha 805 casos de salmonelosis, sin informar el origen. En la ciudad de Quito, entre enero del 2011 y mayo del 2012 se notificaron 12 casos: en el Centro Histórico (3 casos), Guamaní (3), San Bartolomé de las Casas (2), La Tola-Vicentina (1), La Libertad (1) y Cotacollao (2) (Dirección Provincial de Salud de Pichincha, 2012).

El control de la salmonelosis transmitida por alimentos de origen animal debe realizarse en todos los niveles de producción, donde el médico veterinario zootecnista cumple un factor primordial en la prevención en salud pública, a través del desarrollo y control de buenas prácticas de producción así como de la prevención y control de enfermedades. En el año 2010 la Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro–AGROCALIDAD emitió la Guía General de Carácter Voluntario, referente a la Adopción y Certificación de Buenas Prácticas Avícolas (BPA) la cual proporciona herramientas para la crianza de aves sanas y la garantía de productos inocuos para el consumo humano. Dentro de esta se estipulan varios artículos que promueven el control y prevención de la salmonelosis zoonótica y de la Tifosis Aviar (Art. 20, 32, 56, 59 y 60) (AGROCALIDAD, 2010).

*Salmonella gallinarum* y *Salmonella pullorum* son específicas de aves, por lo tanto no tienen importancia en Salud Pública y muy pocas veces se aíslan de humanos, sin embargo, son los principales patógenos de los inicios de la producción aviar intensiva (Valencia, 2007).

Esta investigación tuvo como objetivo determinar la presencia de *Salmonella* spp. en huevos frescos de gallina de los principales mercados de la ciudad de Quito mediante análisis microbiológicos, tipificación y serotipificación de especies en los laboratorios de microbiología de la

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador y del Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito, con la finalidad de notificar a entidades relacionadas con Salud Pública y regulación de los mercados municipales, para promover el control continuo de patógenos transmitidos por alimentos de origen animal.



# CAPÍTULO I

## REVISIÓN DE LITERATURA

### A. Generalidades (Salmonelosis)

La salmonelosis es una enfermedad infecciosa del hombre y los animales causada por microorganismos de dos especies de *Salmonella* (*Salmonella enterica* y *Salmonella bongori*). En el hombre, los microorganismos del género *Salmonella* son agentes etiológicos de infecciones intestinales y sistémicas, por lo general, como contaminantes secundarios de los alimentos, de origen animal y ambiental o, frecuentemente, como consecuencia de la infección subclínica en animales de abasto que provoca la contaminación de la carne, los huevos y la leche o la contaminación secundaria de frutas y verduras que se han fertilizado o regado con desechos orgánicos. La salmonelosis humana es una de las enfermedades zoonóticas más frecuentes y de mayor impacto económico. En todos los países existe la salmonelosis, pero parece tener una mayor prevalencia en áreas de producción animal intensiva, especialmente de cerdos, de terneros y de algunos tipos de aves criadas en cautiverio (con frecuencia, los reptiles son portadores asintomáticos de *Salmonella*) (OIE, 2008).

### B. Etiología

#### 1. Características fisiológicas y estructurales de *Salmonella* spp.

El género *Salmonella* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, son bacilos gram negativos, anaerobios facultativos, generalmente móviles con excepción de *S. gallinarum* y *S. pullorum*. No esporulantes, mesófilas y tiene su crecimiento óptimo a temperaturas entre 35 y 37 °C, pero en general su rango de crecimiento es de 5 a 46 °C. Mueren a temperatura de pasteurización, son sensibles a un pH bajo (4.5 o menos) y no se multiplican a una actividad de agua ( $A_w$ ) de 0.94, en especial en

combinación con un pH de 5.5 o menor. Las células sobreviven largos periodos en estado de congelación y deshidratación. Tiene la capacidad de multiplicarse en muchos alimentos sin afectar las cualidades que lo hacen apetecible (Ray, 2010).

El principal antígeno de la pared celular es el antígeno somático O que consiste en un lipopolisacárido de la superficie externa de la membrana más exterior de la bacteria, este antígeno es termoestable y resistente al alcohol y a los ácidos diluidos. También posee otros antígenos: un núcleo polisacárido (antígeno común), un lípido A (endotoxina), antígenos flagelares (H) que se asocian a los flagelos peritricos y son proteínas termolábiles, antígenos capsulares (K) producidos por los serotipos de *Salmonella* que generan material capsular y son carbohidratos sensibles al calor (Ahmed, 2003; Murray, 2009).

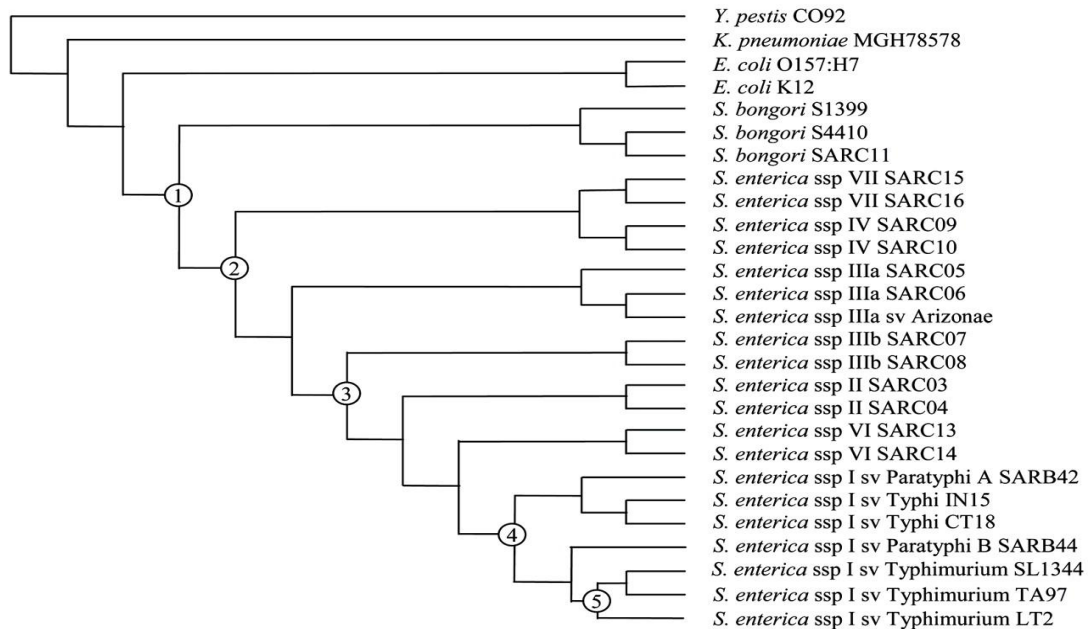
## **2. Clasificación taxonómica de *Salmonella* spp.**

El género *Salmonella* incluye solo dos especies importantes: *S. enterica* y *S. bongori*. *Salmonella enterica* se divide en seis subespecies, que se distinguen por algunas características bioquímicas. Estas subespecies son: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (III<sub>a</sub>), *diarizonae* (III<sub>b</sub>), *houtenae* (IV) e *indica* (VI) (OIE, 2008) (Fig. 1).

*Salmonella bongori* es la segunda especie de *Salmonella* después de *Salmonella entérica* y es considerado un grupo externo distante. Esta especie es específica de reptiles, rara vez se encuentra en las infecciones humanas (NCBI, 2012).

Los estudios de homología de ADN han demostrado que la mayor parte de los aislamientos con importancia clínica pertenecen a la especie *Salmonella enterica*. Se han descrito más de 2500 serotipos únicos para esta sola especie identificados por el sistema de clasificación de Kaufmann y White (Quinn, 2011) (Fig. 2); estos serotipos se suelen establecer como especies individuales (p. ej., *Salmonella typhi*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis*). Estos nombres son incorrectos, pues como ejemplo, la

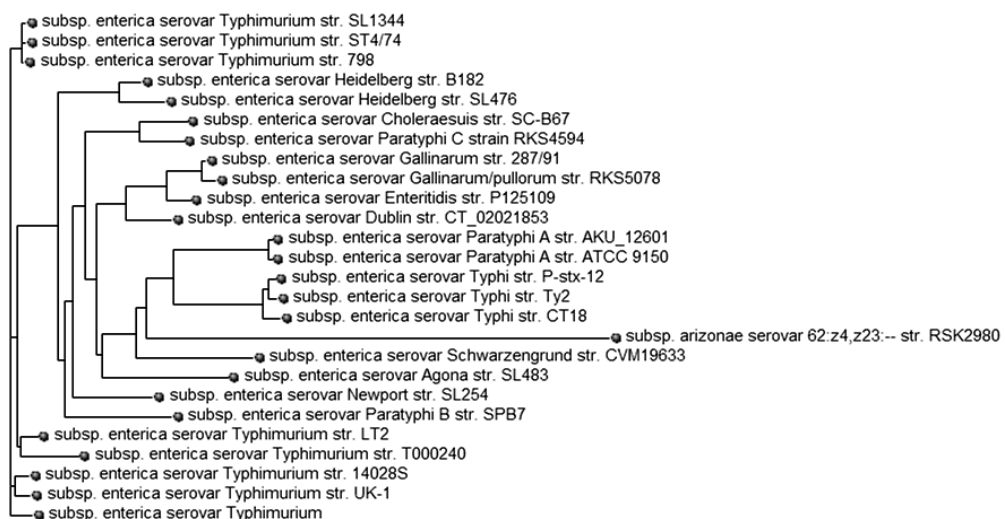
nomenclatura correcta debería ser *Salmonella enterica* serovariante *typhi*, pero la forma habitual de nombrarla es *Salmonella typhi* (Murray, 2009).



**Fig 1. Árbol filogenético del clado *Salmonella*.**

El cladograma fue construido con el programa PAUP \* (Sinauer). Se indican cinco etapas cruciales en la evolución de *Salmonella*: 1, la divergencia de *Salmonella* de *E. coli*, 2, la separación de *S. enterica* de *S. bongori*, 3, la evolución difásica de las cepas *S. enterica*, 4, la partición de *S. enterica* ssp. I, y 5, el desarrollo de STM.

**Fuente:** Porwollik S., 2002.



**Fig 2. Dendrograma de *Salmonella enterica* (Basado en la genómica del Blast)**

**Fuente:** NCBI, 2012

### **C. Patogenia**

Tras la ingesta y la llegada al estómago, las salmonelas se unen a la mucosa del intestino delgado e infiltran las células M (micropliegues) localizadas en las placas de Peyer y los enterocitos. Las bacterias se quedan dentro de una vacuola endocítica, donde se replican. Las bacterias también se pueden transportar a través del citoplasma y liberarse hacia la sangre o la circulación linfática. La regulación del anclaje, el englobamiento y la replicación se debe fundamentar a dos grandes agregados de genes (islotos de patogenicidad, PAI) en el cromosoma bacteriano. El islote de patogenicidad I (PAI I) codifica las proteínas invasivas secretas por *Salmonella* (Ssps) y un sistema de secreción de tipo III que inyecta las proteínas en el interior de las células anfitrión. El islote de patogenicidad II (PAI II) contiene los genes que permiten a la bacteria escapar de la respuesta inmunitaria del anfitrión y en un segundo sistema secretor de tipo III para esta función. En la mayor parte de las infecciones la respuesta inflamatoria la deja limitada al aparato digestivo, mediante la liberación de prostaglandinas y estimula la AMPc y la secreción activa de líquidos (Murray, 2009).

Al contrario de lo que ocurre en otras infecciones por *Salmonella*, las bacterias responsables de la fiebre entérica pasan a través de las células que tapizan el intestino y son engullidas por los macrófagos. Se replican después de ser transportadas al hígado, bazo y médula ósea (Murray, 2009).

### **D. Mecanismos de contaminación de los huevos con *Salmonella*.**

Los huevos pueden estar contaminados en la superficie de la cáscara externa (contaminación horizontal) y/o internamente (contaminación vertical). La contaminación interna puede ser el resultado de la penetración de *Salmonella* a través de la cáscara de los huevos o por la contaminación directa del contenido de los huevos antes de la ovoposición, procedente de la infección de los órganos reproductivos (Timoney et al, 1989; Keller et al, 199.; Miyamoto et al, 1997; Okamura et al, 2001a, b).

A continuación se describe brevemente la patogénesis de la contaminación de los huevos por *Salmonella enteritidis* según la revisión de Gantois, et. al (2009) (Fig. 3).

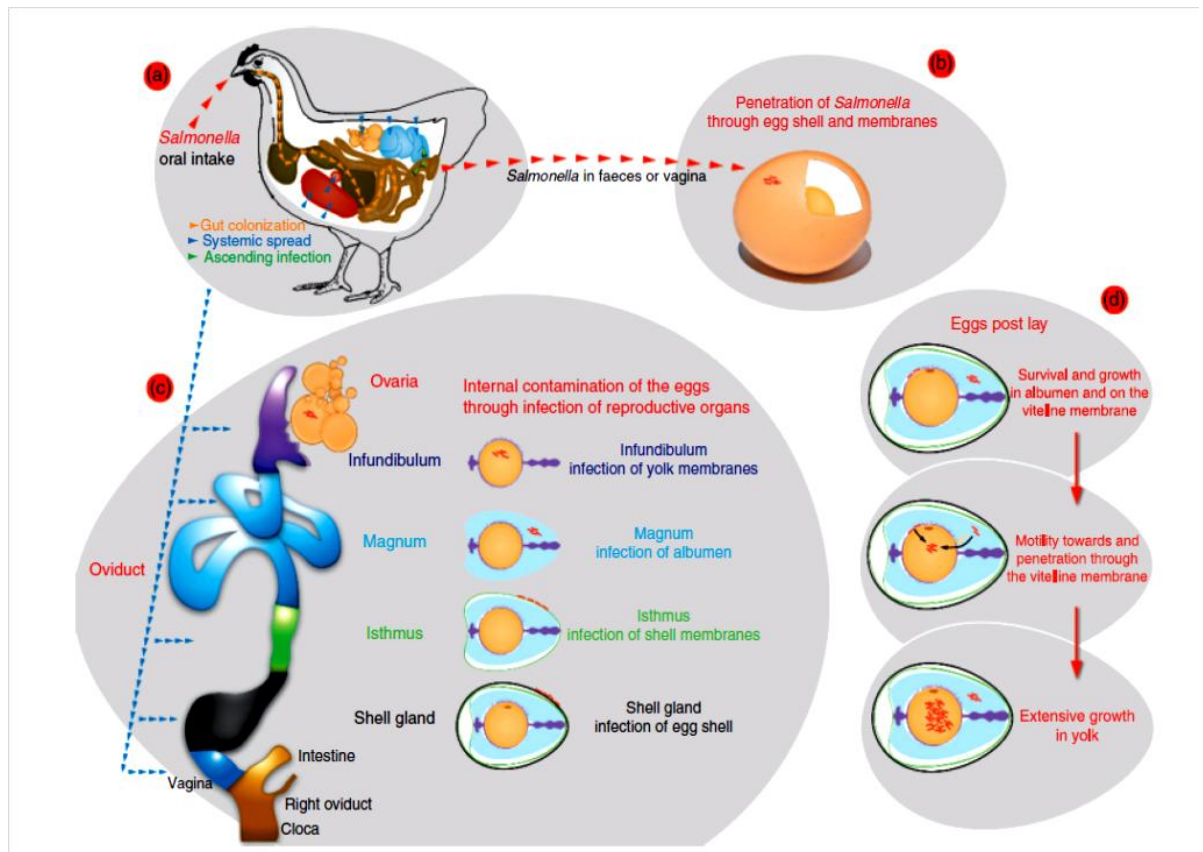
(a) La *Salmonella* ingresa por vía oral y entra en el tracto intestinal de la gallina. Las bacterias colonizan el lumen intestinal donde son capaces de invadir las células epiteliales intestinales (colonización intestinal).

Consecuentemente las células inmunes, específicamente los macrófagos, son atraídos al sitio de la invasión y encierran la bacteria *Salmonella*. Esto permite a las bacterias sobrevivir y multiplicarse en el medio intracelular del macrófago. Estos macrófagos infectados emigran a los órganos internos, tales como los órganos reproductivos (diseminación sistémica). Además de la diseminación sistémica, las bacterias también pueden acceder al oviducto a través de la infección ascendente de la cloaca.

(b) Una vía posible de contaminación de los huevos es por la penetración de *Salmonella* a través de la cáscara del huevo y de sus membranas después de la contaminación de la cáscara exterior. La contaminación superficial puede ser el resultado de una infección de la cloaca o de la contaminación fecal (Messens et al, 2005a; De Reu et al, 2006).

(c) Otra ruta posible es por la contaminación directa de la yema de huevo, la membrana de la yema, la clara de huevo, las membranas de la cáscara y la cáscara de los huevos con una infección originada en ovario, infundíbulo, magnum, istmo y la glándula de la cáscara, respectivamente.

(d) La *Salmonella* alojada en la albúmina y en la membrana vitelina es capaz de sobrevivir y crecer en el medioambiente antibacteriano. También es capaz de migrar y penetrar en la membrana vitelina con el fin de llegar a la yema donde crece ampliamente.



**Fig 3. Patogénesis de la contaminación del huevo por *Salmonella enteritidis*.**

**Fuente:** Gantois, et. al. 2009

## E. Diagnóstico

La detección de *Salmonella* se realiza generalmente mediante el cultivo microbiológico, pero se han desarrollado diversos métodos rápidos, que se basan en las características inmunológicas y en la secuencia de bases de los nucleótidos en los ácidos nucleicos (Ray, 2010).

**1. Cultivo.-** Comprende una fase de preenriquecimiento de la muestra en un caldo de nutrientes, seguida del enriquecimiento selectivo, en un medio de agar diferencial selectivo, así como la confirmación bioquímica y serológica.

### a) Medios de preenriquecimiento.

El número de salmonelas es normalmente bajo en las heces de animales asintomáticos, en muestras ambientales y en alimentos, por lo que es

necesario utilizar medios de preenriquecimiento para facilitar el aislamiento, tal como el agua de peptona tamponada, medios comerciales como Salmoscyst® o el caldo universal de preenriquecimiento. Esto puede permitir que un escaso número de *Salmonella* se multiplique o puede ayudar a la recuperación de las que presentan daños subletales, debido a la congelación, el calentamiento, la exposición a las sustancias microbicidas o a la desecación (OIE, 2008a).

#### **b) Medios de enriquecimiento**

Los medios de enriquecimiento son medios líquidos o semisólidos que contienen sustancias que permiten el crecimiento selectivo de las salmonelas a la vez que inhiben el crecimiento de otras bacterias. La composición del medio, que puede variar de un proveedor a otro, o incluso en algunos casos de un lote a otro, la temperatura y la duración de la incubación, y el volumen de las muestras utilizadas como inóculo del medio, pueden servir para influir en la tasa de aislamiento, y se deben tener siempre en cuenta estas variables. Ejemplos de medios de enriquecimiento son: Rappaport–Vassiliadis (MSRV), Caldo Selenito Cistina, Caldo Trypticase de soya suplementado con sulfato ferroso, Caldo Tetrationato suplementado con bilis Verde Brillante o pastillas de suplemento selectivo comerciales como las Salmoscyst® de Merck. (INEN, 2011; Wallace, 2007; OIE, 2005; OIE, 2008a).

#### **c) Medios selectivos en placa**

Estos son medios selectivos solidificados con agar que permiten un crecimiento diferencial en varios aspectos. Inhiben el crecimiento de bacterias distintas a *Salmonella* y suministran información sobre algunas de las principales características bioquímicas diferenciales, normalmente la incapacidad de fermentar la lactosa y la producción de sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S). Los resultados se obtienen después de 24 y 48 horas de cultivo a 37°C. En dichos medios *Salmonella* forma colonias características que son distintas de las producidas por otras bacterias en la placa, con la posible excepción de *Proteus*, *Pseudomonas* y *Citrobacter*. En ocasiones, se pueden aislar salmonellas fermentadoras de

la lactosa y la producción de H<sub>2</sub>S puede ser variable. Ejemplos de medios selectivos sólidos son: agar Xilosa-Lisina-Dexosicolato (XLD), agar Salmonella-Shigella (SS), agar Verde-Brillante Rojo-Fenol, agar Bismuto Sulfito, agar Entérico Hektoen (HE), el agar Rambach, entre otros (INEN, 2011; Wallace, 2007; OIE, 2005; OIE, 2008a).

#### **d) Identificación de colonias sospechosas.**

Las colonias sospechosas se subcultivan en medios sólidos selectivos y no selectivos para asegurar la ausencia de posibles contaminantes como *Proteus* spp. Si hay un crecimiento abundante en cultivo puro, las colonias sospechosas se pueden probar por aglutinación en porta con sueros polivalentes para la tipificación de *Salmonella*, sin embargo, deben someterse a pruebas bioquímicas para confirmar la identificación (Tabla 1). Estas pruebas se pueden realizar con azúcares en agua de peptona o con sistemas comerciales (tales como el sistema Índice de Perfil Analítico [API]), la prueba OBIS o en medios compuestos (tales como el agar triple azúcar-hierro [TSI]).

La identificación serológica, según el esquema de Kauffman y White, de los antígenos O y H, y, en circunstancias especiales, del antígeno Vi, se realiza mediante aglutinación directa en porta o por aglutinación en tubo utilizando antisueros específicos (OIE, 2008a).

**2. Métodos de reconocimiento inmunológicos y de ácidos nucleicos.-** Estos incluyen métodos basados en la conductancia/impedancia eléctrica, en la separación inmunomagnética (IMS), en los enzoinmunoensayos (ELISA), métodos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con sondas génicas, incluyendo la amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA) y en la PCR en tiempo real. Muchos de estos métodos resultan más adecuados para el análisis de alimentos humanos pero no han sido validados para muestras fecales y ambientales (OIE, 2008).



**Tabla 1.** Test bioquímicos más utilizados en la diferenciación de *Salmonella* de otros miembros de la familia Enterobacteriaceae y la identificación de *Salmonella* serotipos Typhi y Paratyphi A<sup>a</sup>

TEST	<i>Salmonella</i> no tifoidea	<i>Salmonella typhi</i>	<i>Salmonella paratyphi A</i>
TSI	K/Ag	K/A	K/Ag
H <sub>2</sub> S (TSI)	+	+ débil	o + débil
Indol	-	-	-
Rojo de metilo	+	+	+
Voges-Proskauer	-	-	-
Citrato de Simmons	+	-	-
Urea	-	-	-
Lisina descarboxilasa	+	+	-
Arginina dihidrolasa	+	D	(+)
Ornitina descarboxilasa	+	-	+
Motilidad	+	+	+
Mucato	+	-	-
Malonato	-	-	-
Glucosa	Ag	A	Ag
Lactosa	-	-	-
Sucrosa	-	-	-
Salicina	-	-	-
Dulcitol	Ag	-	Ag <sup>2 días</sup>
Inositol	D	-	-
Sorbitol	Ag	A	Ag
ONPG <sup>b</sup>	-	-	-
Galacturonato	-	-	-

<sup>a</sup> Reacciones después de la incubación a 37°C. K, alcalino; A, ácido; g, gas; +, 90% o más positivos dentro de 1 o 2 días; (+), reacción positiva después de 3 o más días; -, no hay reacción (90% o más) en 7 días; d, reacciones diferentes {+, (+), -}.

<sup>b</sup> ONPG, o-nitrofinil-β-D-galactopiranosida para la detección de la actividad β-galactosidasa.

**FUENTE:** Murray, 1999.

## F. Signos y síntomas

### 1. Salmonelosis en humanos:

a) **Gastroenteritis.** La gastroenteritis es la forma más frecuente de salmonelosis. Los síntomas suelen aparecer entre las 6 y 48 horas siguientes a la ingestión de alimentos o agua contaminada, con una sintomatología inicial de náuseas, vómitos y diarrea no sanguinolenta.

Son también frecuentes la fiebre, los espasmos abdominales, las mialgias y la cefalea. En la forma aguda de la enfermedad se puede demostrar la afectación colónica. Los síntomas pueden persistir entre dos días y una semana antes de la resolución espontánea (Murray, 2009).

b) **Septicemia.** Todas las especies de *Salmonella* pueden dar lugar a la bacteriemia, aunque las infecciones por *S. choleraesuis*, *S. paratyphi* y *S. typhi* son las que con mayor frecuencia las producen. El riesgo de bacteriemia por *Salmonella* es más alto en pacientes pediátricos, geriátricos o con inmunodeficiencias congénitas. La presentación clínica de la bacteriemia por *Salmonella* es idéntica a otras bacteriemias por gram negativos, aunque pueden aparecer infecciones supurativas localizadas (osteomielitis, endocarditis y artritis), hasta en el 10% de los pacientes (Murray, 2009).

c) **Fiebre entérica.** *S. typhi* produce una enfermedad febril conocida como fiebre tifoidea. Una forma leve de esta enfermedad, la fiebre paratifoidea, se produce por *S. paratyphi* A, *Salmonella schottmuelleri* (anteriormente conocida como *S. paratyphi* B) y *Salmonella hirschfeldii* (anteriormente conocida como *S. paratyphi* C). Al contrario de lo que ocurre en otras infecciones por *Salmonella*, las bacterias responsables de la fiebre entérica pasan a través de las células que tapizan el intestino y son engullidas por los macrófagos. Se replican después de ser transportadas al hígado, bazo y médula ósea. Entre 10 y 14 días después de la ingestión de bacilos, los pacientes presentan fiebre que va aumentando progresivamente con síntomas inespecíficos como cefalea, mialgias, malestar general y anorexia. Estos síntomas duran al menos 1 semana y son seguidos por síntomas gastrointestinales. Este ciclo se corresponde con una fase inicial que se sigue de la colonización de la vesícula biliar y posteriormente de la reinfección del intestino. La fiebre entérica es una enfermedad clínica grave, que se debe sospechar en pacientes febriles donde la enfermedad es endémica o que hayan viajado recientemente a países en vía de desarrollo (Murray, 2009).

d) **Colonización asintomática.** Las especies de *Salmonella* responsables de producir fiebre tifoidea y paratifoidea se mantienen por la colonización del ser humano. La colonización crónica durante más de un año después de una enfermedad sintomática se produce entre el 1 y el 5% de los pacientes y la vesícula biliar es el responsable en la mayoría de ellos. La colonización crónica por otras especies de *Salmonella* sucede en menos del 1% de los pacientes y no es una fuente importante de infección en el ser humano (Murray, 2009).

## **2. Salmonelosis en aves de corral:**

a) **Tifosis Aviar.-** Es causada por la *Salmonella gallinarum*, afecta no solo a los pollos y gallinas sino también a aves de otras especies como pavos, codornices, palomas, faisanes, gallinas de guinea, y ciertos tipos de aves de adorno y silvestres (OIE, 2008b).

Los síntomas más importantes pueden incluir: repentina baja en el consumo de alimento, depresión, plumaje erizado, diarrea verde-amarillenta, baja en la producción de huevos, disminución de la fertilidad e incubabilidad y elevada mortalidad (OIE, 2008b).

Las lesiones más importantes incluyen alteraciones de los principales órganos internos como: hígados congestionados y agrandados, a menudo con focos necróticos blanquecinos, en casos crónicos el hígado presenta estrías de un color bronceado característico, bazo y riñones congestionados y agrandados; ovario congestionado con ruptura de óvulos que degeneran en una peritonitis caseosa extensiva (Ruano, 2009; (OIE, 2008b).

b) **Pullorosis Aviar:** Esta enfermedad es causada por *Salmonella pullorum* y se conoce también como diarrea blanca bacilar de los pollitos, es una enfermedad que afecta con más regularidad a los pollitos y aves jóvenes (OIE, 2008b).

Los síntomas más importantes pueden incluir: mortalidad incrementada de pollitos durante la eclosión o inmediatamente después de nacidos, diarrea

blanquecina profusa que causa “empastamiento” de los pollitos, dificultad para respirar, tarsos inflamados.

Las lesiones más importantes pueden incluir: pericarditis (pericardio engrosado y amarillento), miocarditis (nódulos visibles sobre el miocardio), hígado, bazo y riñones agrandados y congestionados y tarsos inflamados conteniendo un fluido viscoso amarillento (Ruano, 2009).

### **G. Tratamiento**

No se recomienda el tratamiento antibiótico en la enteritis porque la duración de la enfermedad puede prolongarse, lo aconsejable es la hidratación. Las infecciones con *S. typhi* y *S. paratyphi* o las infecciones diseminadas con otros microorganismos se deben tratar con un antibiótico eficaz seleccionado con las pruebas de sensibilidad *in vitro*; se pueden usar fluoroquinolonas (p.ej., ciprofloxacina), cloranfenicol, trimetoprim-sulfametoxazol o una cefalosporina de amplio espectro (Murray, 2009).

### **H. Prevención**

La mayoría de las infecciones se pueden controlar preparando adecuadamente las aves y los huevos (completamente cocidos) y evitando la contaminación cruzada de otros alimentos con productos avícolas poco cocinados. Se puede identificar y tratar a los portadores de *S. typhi* y *S. paratyphi*. La vacunación frente a *S. typhi* puede reducir el riesgo de enfermedad en los viajeros a áreas endémicas (Murray, 2009).

A nivel de las granjas avícolas el control de la salmonelosis debe estar orientado a prevenir no solamente las pérdidas directas en producción ocasionadas por *S. gallinarum*, sino también a prevenir el contagio de infecciones que tienen repercusión en salud pública (*S. enteritidis*, *S. typhimurium*) (Ruano, 2009). Por otro lado, un programa integral de control de la infección debería contemplar la implementación de buenas prácticas de manejo y producción, bioseguridad y vacunación. Por supuesto, ningún programa podría ser exitoso a largo plazo, sin la organización y cooperación conjunta de productores y entidades estatales encargadas de apoyar y estimular al sector agropecuario (Ruano, 2009).

## I. Epidemiología

En el Ecuador las enfermedades transmitidas por agua y alimentos (ETAs) están entre las diez primeras enfermedades transmisibles de notificación obligatoria (MSP, 2007). Las ETAs reportadas en el país son: *Escherichi coli*-Enterotoxígena, Salmonellosis, Fiebre Tifoidea, Shigellosis, Brucelosis, Botulismo, Cólera, Hepatitis A, Cisticercosis, Giardiasis, Ascaridiasis, Amebiasis y Angiostrongiliasis (García,et.al; MSP, 2009).

En la Unión Europea se registraron 5.262 brotes alimentarios durante 2010, con un ligero descenso respecto al 2009. Los brotes notificados afectaron a más de 43.000 personas y causaron 25 muertes. Las causas notificadas más frecuentes fueron *Salmonella* (31% de todos los brotes), los virus como norovirus (15%) y *Campylobacter* (9%). Las fuentes alimentarias más importantes de los brotes fueron los huevos y los ovoproductos, las comidas tipo bufé y las verduras y productos derivados (ECDC, 2011).

En Estados Unidos se reportaron 9,4 millones de casos de ETAs, con 1.351 muertes en el 2011. Norovirus representó más de la mitad de los casos y *Salmonella* fue la segunda causa más común con 1.027.561 casos (11%) pero fue la primera causa de hospitalizaciones y muertes (CDC, 2011).

En el Ecuador en el año 1990 se reportaron 9.908 casos de salmonelosis, en el 2001 esta cifra aumentó bruscamente a 18.772, periodo desde el cual el número ha ido disminuyendo paulatinamente con 3.286 casos en el 2008 (MSP-EPI 2, 2008) (Fig 5). De enero a febrero del 2012, se han notificado 175 casos de infecciones debidas a *Salmonella* los cuales 153 se han confirmado así como 116 casos de Fiebre Tifoidea y Paratifodea de los cuales 103 son confirmados (MSP, 2012).

En el 2011 se reportaron en la provincia de Pichincha 805 casos de salmonelosis. En la ciudad de Quito entre enero del 2011 y mayo del 2012 se notificaron 12 casos: en el Centro Histórico (3 casos), Guamaní (3), San Bartolomé de las Casas (2), La Tola-Vicentina (1), La Libertad (1) y

Cotacollao (2) (Dirección Provincial de Salud de Pichincha, 2012) (Tabla 3).

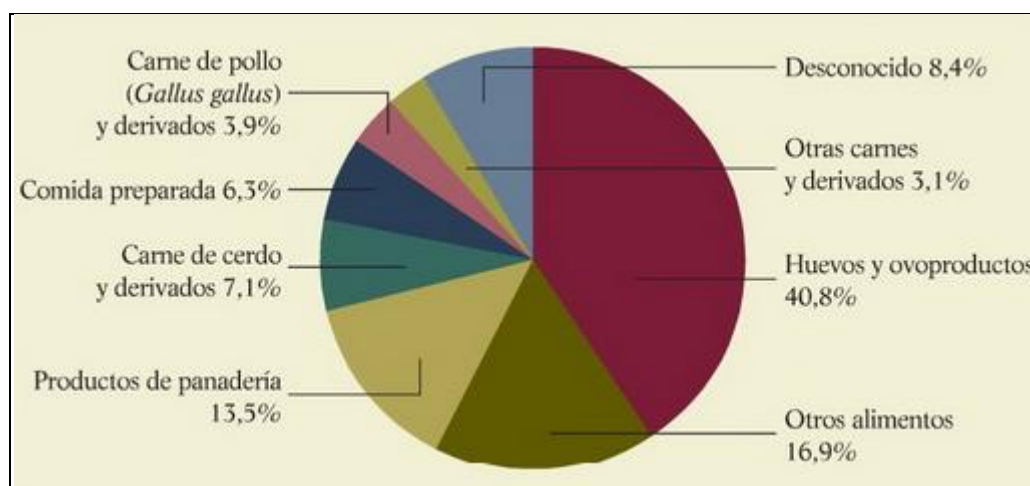
En la ciudad de Quito en el Laboratorio de Alimentos de la Unidad Municipal de Salud Centro, entre los años 2011 y 2012 se han analizado pocas muestras de mayonesa casera en las cuales no ha habido presencia de *Salmonella* spp. y en lo que concierne a carne de pollo cruda y huevos crudos, no se han realizado investigaciones.

En un estudio realizado en el Centro de Salud de Guamaní de la ciudad de Quito, entre los meses de febrero y mayo de 2012, con el objetivo de identificar microorganismos patógenos asociados a diarrea aguda, realizado en 200 personas, mediante protocolos de microscopía directa y tinción, cultivo, ensayo inmunocromatográfico y reacción en cadena de la polimerasa, no se encontró *Salmonella*, pero se evidenciaron otros patógenos intestinales como: rotavirus, norovirus, patotipos de *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *E. coli* Shigellae, *Vibrio* spp., *Campylobacter jejuni/coli*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica/dispar* y *Cryptosporidium parvum*. (Vasco, 2012).

Algunas investigaciones orientadas a la detección de *Salmonella* en huevos realizadas en países hispanoamericanos han determinado una baja incidencia de serotipos de *Salmonella* importantes en Salud Pública. En Perú de 680 huevos frescos de gallina, provenientes de cuatro granjas y dos mercados, se determinó la presencia de dos especies de *Salmonella* sin importancia en Salud Pública: *S. djugu* y *S. mbandaka* (Lévano, et. al; 2001). En Argentina se han realizado varios estudios, el primero de 800 huevos se aisló *Salmonella* en una sola muestra, la cual correspondió a la serovariedad *S. gallinarum*, en el segundo estudio se analizaron 8000 huevos recién puestos, siendo negativo el total de las muestras, sin embargo, también se estudiaron cien bandejas (reutilizables) para la recolección de huevos, de las cuales cincuenta fueron positivas a *Salmonella enteritidis* (Franseschi, 1996). Otro estudio donde se analizaron 44 muestras de huevos frescos y 24 muestras de

mayonesa de fabricación casera las que fueron negativas a *Salmonella* (Amer, 1999). En Colombia en el Laboratorio de Salud Pública (LSP) de Bogotá, se analizaron 104 muestras de diferentes grupos de alimentos durante una vigilancia rutinaria entre febrero y abril del 2004, de las cuales 5 (4,8%) fueron positivas para *Salmonella* spp. cuyas fuentes fueron productos cárnicos crudos en tres casos, uno de queso y una de pollo asado mientras que en huevos no se evidenció la presencia de dicho patógeno (Castañeda et al, 2004). En otro estudio realizado por Durango y colaboradores en las ciudades de Barranquilla, Montería, Sincelejo y Cartagena, se aislaron 47 cepas de *Salmonella* spp. (7,4 % de todos los aislamientos) de un total de 636 muestras de alimentos de origen animal provenientes de ventas callejeras, restaurantes y plazas de mercado: 9,3% (19/204) se encontró en carne de res; 12,6% (12/95) en chorizo; 7,9% (6/76) en queso, 5,2% ( 6/115) en carne de cerdo, 1,6% (2/127) en pollo y 10,5% (2/19) en arepa de huevo (Tabares del Campo, 2001). Rodríguez et. al, 1994, analizó diez granjas avícolas de postura en la sabana de Bogotá: de un total de 600 sueros de gallinas ponedoras examinados, 32 fueron positivos, (5,3%) y de 224 huevos, 72 yemas fueron positivas (32,1%) para *Salmonella enteritidis*. En Chile, en un total de 1081 huevos (distribuidos en muestras de doce huevos cada una) fueron analizados a nivel interno y externo separadamente. Se evidenció una muestra positiva (a nivel interno) en dicho estudio correspondiente a *Salmonella enteritidis*. Por otro lado en el mismo estudio a nivel de carne de ave y menudencia de pollo, de un total de 1524 muestras 144 (9,44%) fueron positivas a *Salmonella* spp. de las cuales 108 pertenecieron a *Salmonella enteritidis* (Pozo M. et al, 2000). En México, de un estudio en 400 huevos, pertenecientes a diez marcas comerciales, se pudo evidenciar la presencia de una muestra contaminada con *Salmonella enteritidis* (Mancero et. al 2005). En Cuba, de 990 huevos estudiados (repartidos en 330 muestras: tres huevos por muestra) se obtuvieron 2 muestras positivas una no tipificable y la otra fue *Salmonella zioria* (Leyva et. al, 1996).

Si bien el huevo constituye una importante fuente de transmisión (Fig 4), hay otro tipo de alimentos o productos de origen animal que toman importancia en la incidencia de salmonelosis (Tabla N° 2). Los animales en producción son propensos actuar como portadores de la enfermedad y finalmente transmitirla.



**Fig 4. Alimentos implícitos en brotes de *Salmonella* en la UE, año 2008**

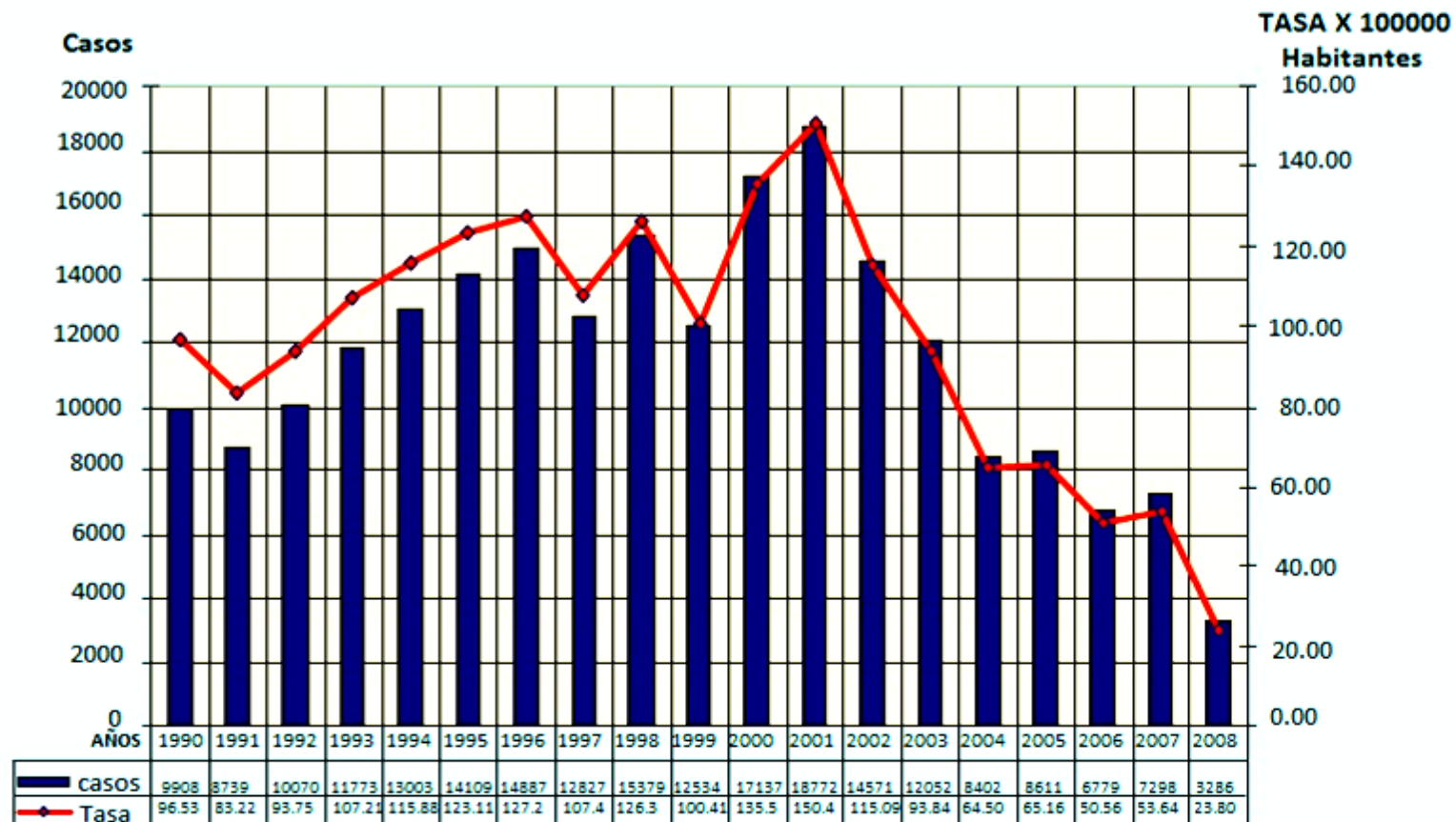
**Fuente:** EFSA, 2010

**Tabla 2. Estudio de *Salmonella* en diferentes tipos de carne**

Tipo de Carne	# de Muestras	% Positivos
Pollo	31439	10,7
Cerdo	16573	5,4
Vaca/Buey	5871	2,2
Ternera	3783	0,4
Carne picada de vacuno	74758	3,4
Carne picada de pollo	997	15,7
Carne picada de pavo	3712	29,2

**Fuente:** Food Safety and Inspection Service, U.S. (FSIS) 1998-2001





FUENTE: EPI-2  
ELABORACIÓN: Eduardo Aguilar J./ EPIDEMIOLOGÍA

Casos Tasas

**Fig 5. Casos y Tasas de Salmonelosis en el Ecuador entre 1990 y 2008**

**Tabla 3. Enfermedades debidas a *Salmonella* en la Provincia de Pichincha en el 2011 y entre enero y mayo de 2012.**

Área	2011				2012			
	Reportados		Confirmados		Reportados		Confirmados	
	Fiebres tifoidea y paratifoidea	Infecciones debidas a <i>Salmonella</i>	Fiebres tifoidea y paratifoidea	Infecciones por <i>Salmonella</i>	Fiebres tifoidea y paratifoidea	Infecciones por <i>Salmonella</i>	Fiebres tifoidea y paratifoidea	Infecciones por <i>Salmonella</i>
Área 1 - Centro Histórico	14	2	12	2	2	1	2	1
Área 10 - San Carlos	—	—	—	—	—	—	—	—
Área 11 - Pedro Vicente Maldonado	22	—	18	—	4	—	4	—
Área 12 – Cayambe	—	—	—	—	1	—	—	—
Área 15 – Sangolquí	6	—	3	—	—	—	—	—
Área 18 – Nanegalito	7	5	6	5	5	—	3	—
Área 19 – Guamaní	11	3	11	2	—	—	—	—
Área 2 - San Bartolomé de las Casas	1	2	1	—	—	—	—	—
Área 20 – Chillogallo	—	—	—	—	—	—	—	—
Área 21 – Calderón	—	—	—	—	—	—	—	—
Área 23 - La Concordia	1	1	1	1	—	—	—	—
Área 24 – Conocoto	—	—	—	—	—	—	—	—
Área 3 - La Tola - Vicentina	1	1	—	1	—	—	—	—
Área 4 – Chimbacalle	1	—	1	—	—	—	—	—
Área 5 - La Magdalena	—	—	—	—	—	—	—	—
Área 6 - La Libertad	—	—	—	—	—	1	—	1
Área 8 – Cotacollao	3	2	2	2	5	5	—	—
Área 9 - Comité Del Pueblo	1	—	1	—	—	—	—	—
Fuera De Área - Privado	6	2	6	1	—	2	—	2
Fuera De Área - Público	9	793	6	26	—	4	—	4
<b>Total General</b>	<b>83</b>	<b>811</b>	<b>68</b>	<b>40</b>	<b>16</b>	<b>9</b>	<b>14</b>	<b>8</b>

**Fuente:** Dirección Provincial de Salud de Pichincha, 2012.

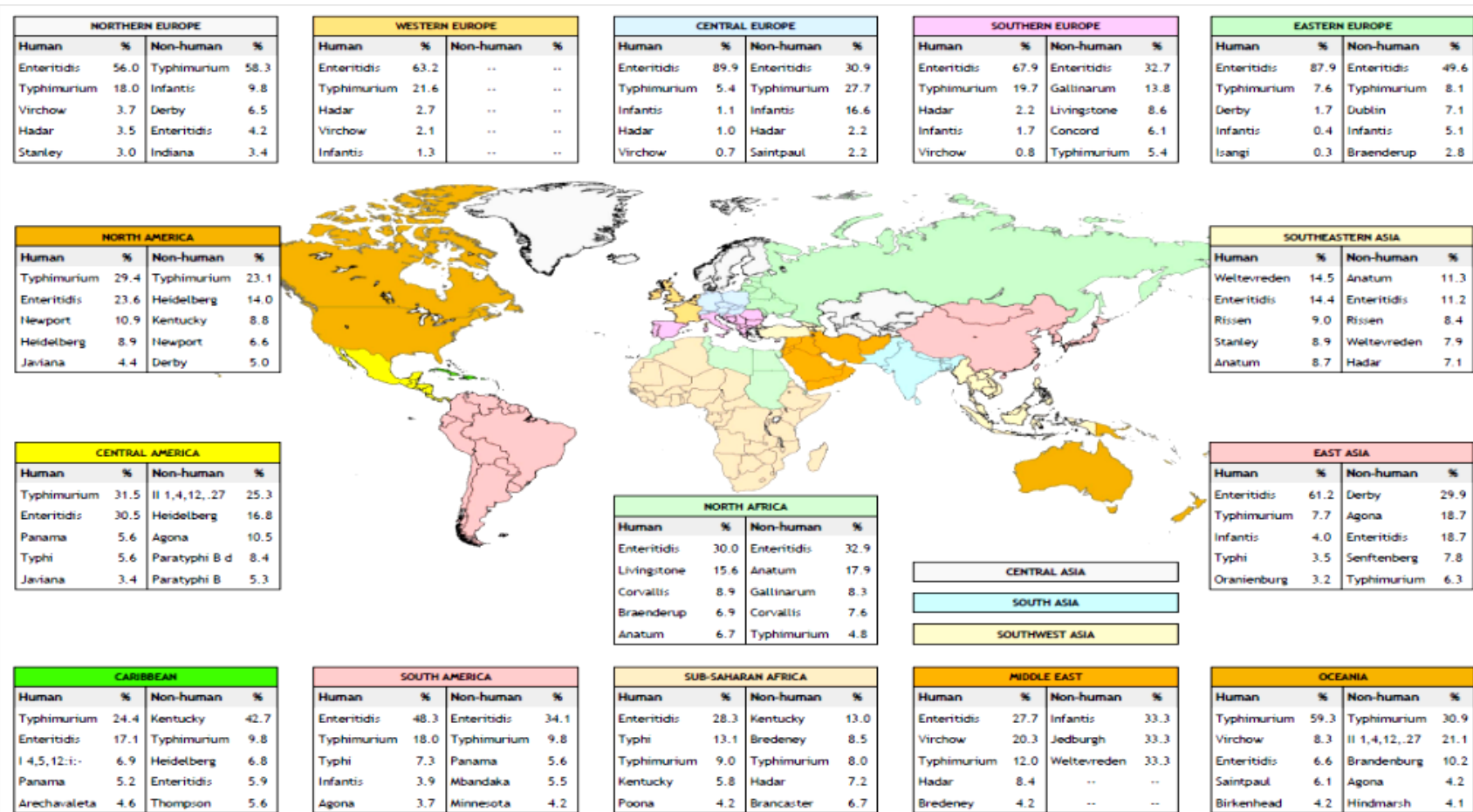


Fig 6. Distribución mundial de especies de *Salmonella* en fuentes humanas y no humanas.

Fuente: Vieira, et al. 2009.

## CAPÍTULO III

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### A. Localización del área de estudio.

**1. Localización del área de muestreo:** El muestreo se realizó en la ciudad de Quito en quince mercados de las zonas administrativas: Quitumbe, Eloy Alfaro, Manuela Sáenz, Eugenio Espejo, La Delicia y Calderón.

**Tabla 4. Mercados seleccionados para el estudio**

<b>Zona Administrativa</b>	<b>N°</b>	<b>Nombre</b>	<b>Dirección</b>
Zona Quitumbe	1	Guamaní	Av. Maldonado
	2	Las Cuadras	Matilde Álvarez y Mariscal
Zona Sur (Eloy Alfaro)	3	Chiriyacu	Andrés Pérez y Calvas
	4	La Magdalena	Cacha y Puruhá
	5	Mayorista	Ayapamba y Teniente Ortiz
Zona Centro (Manuela Sáenz)	6	América	Buenos Aires y Uruguay
	7	Central	Av. Pichincha y Esmeraldas
	8	San Francisco	Rocafuerte e Imbabura
Zona la Delicia	9	Cotocollao	Av. Diego de Vásquez de Cepeda
Zona Centro	10	San Roque	Cumandá y Av. 24 de Mayo
Zona Norte (Eugenio Espejo)	11	Comité del Pueblo	Fco. Endara y Rodríguez
	12	Iñaquito	Calle Pereira e Iñaquito
	13	Santa Clara	Versalles y R. Dávalos
Zona Calderón	14	Calderón	9 de agosto y Paredes
	15	Carapungo	Calle "G" y Neptalí Godoy Calle B-5

**Fuente:** CMFPM, 2011.

**2. Localización de los sitios de análisis de laboratorio:** Los análisis microbiológicos se realizaron en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Central del Ecuador y en el Laboratorio de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito.

**B. Materiales:**

**1. Materiales para la toma de muestras de huevos**

- Fundas Wirlpack estériles
- Guantes de látex
- Marcadores permanentes
- Termos
- Bolsas de hielo químico
- Hojas de encuesta y de de registro de las muestras
- Tableros
- Esferos
- Cámara fotográfica

**2. Materiales para el estudio microbiológico**

- Fundas Wirlpack de 500 ml.
- Frascos de vidrio autoclavables de 500 ml.
- Frascos autoclavables de 1000 ml
- Pipetas estériles de 10 ml
- Tubos de ensayo estériles
- Cajas petri desechables
- Probetas
- Hisopos estériles
- Palillos largos estériles
- Palillos cortos estériles (mondadientes)
- Pinzas
- Cucharas estériles
- Jeringuillas de 5 ml
- Mechero
- Encendedor eléctrico
- Balanza electrónica
- Incubadora
- Refrigerador
- Congelador -20°C
- Destilador de agua
- Alcohol potable al 70%

- Toallas de papel desechables
- Algodón
- Piseta
- Guantes de látex
- Tubo de crioconservación
- Programa API 20E
- Computador

### **3. Medios y reactivos para el estudio microbiológico (Anexo B)**

- Agua Destilada Estéril
- Caldo y tabletas de suplemento selectivo Salmocyst (Merck)
- Agar XLD (Xylosa-Lysina-Desoxicolato) (DIFCO)
- Agar SS (Salmonella-Shigella) (NEOGEN)
- Agar TSI (Triple azúcar y hierro) (DIFCO)
- Agar Citrato de Simons (DIFCO)
- Agar SIM (Sulfato, Indol y Movilidad) (DIFCO)
- Agar Urea (DIFCO)
- Agar Tripticasa de Soya (TSA) como agar nutritivo (DIFCO)
- Caldo Infusión Cerebro Corazón (DIFCO)
- Cloruro de Sodio (Merck)
- Glicerol
- Kit de API 20 E (bioMérieux S.A.)
- Tiras de Oxidasa (Merck)
- Aceite mineral
- Reactivo de Kovac
- Reactivos para revelación de pruebas bioquímicas (VP1 = KOH 40%, VP2 =  $\alpha$ -naftol, TDA =  $\text{FeCl}_3$  10%, IND = Reactivo de Kovac o de Dimetilamino- cinamaldehido).

## **C. Métodos**

- 1. Tipo de Diseño Experimental:** Estudio dirigido a los mercados.
- 2. Tipo de muestreo:** Selección aleatoria de los huevos de todos los expendios.

### **3. Selección del tamaño de la muestra**

- a) **Número de mercados:** Se escogieron al azar 15 mercados ubicados dentro de la ciudad de Quito, que representan el 28,30% del total de mercados del Distrito Metropolitano (CMFPM, 2011).
- b) **Número de expendios de huevos:** Se tomaron muestras de todos los expendios de huevos de los mercados seleccionados.
- c) **Número de salidas de campo:** Se realizaron dos tomas de muestras en los expendios de huevos: uno inicial y otro de replicación un mes después.
- d) **Número de huevos:** De cada expendio se colectaron seis huevos, tres en la primera toma y tres en la segunda.
- e) **Número de muestras para el análisis microbiológico:** Cada muestra estuvo conformada por un grupo de 3 huevos.

### **4. Periodo del estudio:** Las muestras se recolectaron y procesaron entre febrero y marzo del 2012.

### **5. Toma de muestras y realización de encuestas:**

- a) Se visitó cada uno de los mercados seleccionados previamente y se realizó un recorrido del lugar identificando todos los expendios de huevos.
- b) En el muestreo inicial se realizaron encuestas relacionadas a la procedencia, manejo y comercialización de los huevos en cada expendio (Anexo C).
- c) En cada expendio se colectaron 3 huevos al azar en fundas Wirlpack estériles. Las unidades experimentales cumplieron las siguientes características: huevos sin heces fecales en la cáscara, tamaño homogéneo y huevos sanos sin grietas o aberturas. Se tomaron muestras en los mismos expendios un

mes después.

- d) Se rotuló cada muestra con el código respectivo. La codificación se realizó de la siguiente manera: M00-E00-#0  
Dónde: M = Mercado (01-15); E = # de expendio (01 - 12); # = Número de muestreo (1 - 2); y 0= Número asignado
- e) Las muestras se almacenaron dentro de un termo con bolsas de hielo químico, a una temperatura aproximada de 4 °C.

## 6. Procesamiento microbiológico de los huevos

- a) Todo el procesamiento microbiológico se realizó bajo los siguientes criterios:
  - (1) Desinfectar todas las superficies con alcohol al 70% antes de iniciar con el procesamiento.
  - (2) Trabajar frente a un mechero.
  - (3) Utilizar mandil, guantes de látex y mascarilla.
  - (4) Disponer de un recipiente adecuado para eliminar palillos e hisopos contaminados.
  - (5) Disponer de una funda roja para eliminar los desechos producto del procesamiento microbiológico.
  - (6) Utilizar materiales estériles.
  - (7) Guardar todas las normas de bioseguridad establecidas en cada uno de los laboratorios.
- b) Se trituraron los huevos dentro de la funda Wirtpack hasta tener una muestra homogénea.
- c) Se pesaron 25 g de la muestra en un recipiente estéril junto al mechero.
- d) **Pre-Enriquecimiento:** Se colocaron los 25 gramos de la muestra en 225 ml de Caldo Salmocyst (Anexo B) y se incubaron por 6 a 8 horas a 37°C.
- e) **Enriquecimiento Selectivo:** Se transfirieron 10 ml del caldo



pre-enriquecido a un tubo estéril, se colocó la tableta de suplemento selectivo, se la disolvió y se incubó por 24 horas a 37°C.

- f) **Aislamiento:** Se introdujo un hisopo estéril dentro del tubo, se agitó y se realizó el inóculo primario en los medios: Agar Xilosa Lisina Desoxicolato (XLD) y Agar Salmonella-Shigella (SSA) (Anexo B) se sembraron por estriación e incubaron por 24 horas a 37°C. Cada muestra se sembró por duplicado en estos medios.
- g) **Subcultivo:** Se seleccionaron las colonias típicas: En XLD se vieron colonias rojas con o sin centro negro y en SSA colonias blancas con o sin centro negro. En algunos cultivos, se evidenciaron más de 2 colonias sospechosas que presentaron morfología distinta, las cuales fueron procesadas individualmente. Estas colonias se sembraron en agar nutritivo.
- h) **Crioconservación:** Las cepas sospechosas del subcultivo se sembraron en agar nutritivo en tubo e incubaron por 24 horas a 37°C. Se colocó 1500 µl de Caldo Infusión Cerebro Corazón al 10% de glicerol y con un palillo estéril se resuspendieron las bacterias. El caldo se vertió en un tubo criogénico y se mantuvo a -20°C.
- i) **Pruebas Bioquímicas Preliminares:** Se revivieron las cepas sospechosas sembrándolas nuevamente en Agar Nutritivo y se incubaron por 24 horas a 37°C. Estos aislados se sembraron en los siguientes medios:
  - (1) **Agar Hierro Triple azúcar (TSI):** El medio se repartió en tubos y se formó un pico de flauta. Se sembró por estocado y estriado en el pico de flauta.
  - (2) **Agar Citrato:** El medio se repartió en tubos y se formó un pico de flauta. Se sembró estriación en el pico de flauta.

- (3) **Agar Sulfato Indol Movilidad (SIM):** El medio se repartió en tubos y se sembró por estocado.
- (4) **Agar Urea:** El medio se repartió en tubos y se formó un pico de flauta. Se sembró por estriado en el pico de flauta.
- (5) **Oxidasa:** Se realizó la prueba de Oxidasa con tirillas reactivas.

Los resultados esperados de estas pruebas bioquímicas para *Salmonella* spp. fueron (Murray, 1999):

- Oxidasa = negativo
- TSI = Alcalino/Ácido (K/A) (con producción de  $H_2S$ )
- Indol = Negativo
- Citrato = Positivo
- Urea = Negativo

j) **Pruebas Confirmatorias:** Se utilizó la Galería API 20E con el siguiente procedimiento según las indicaciones del fabricante:

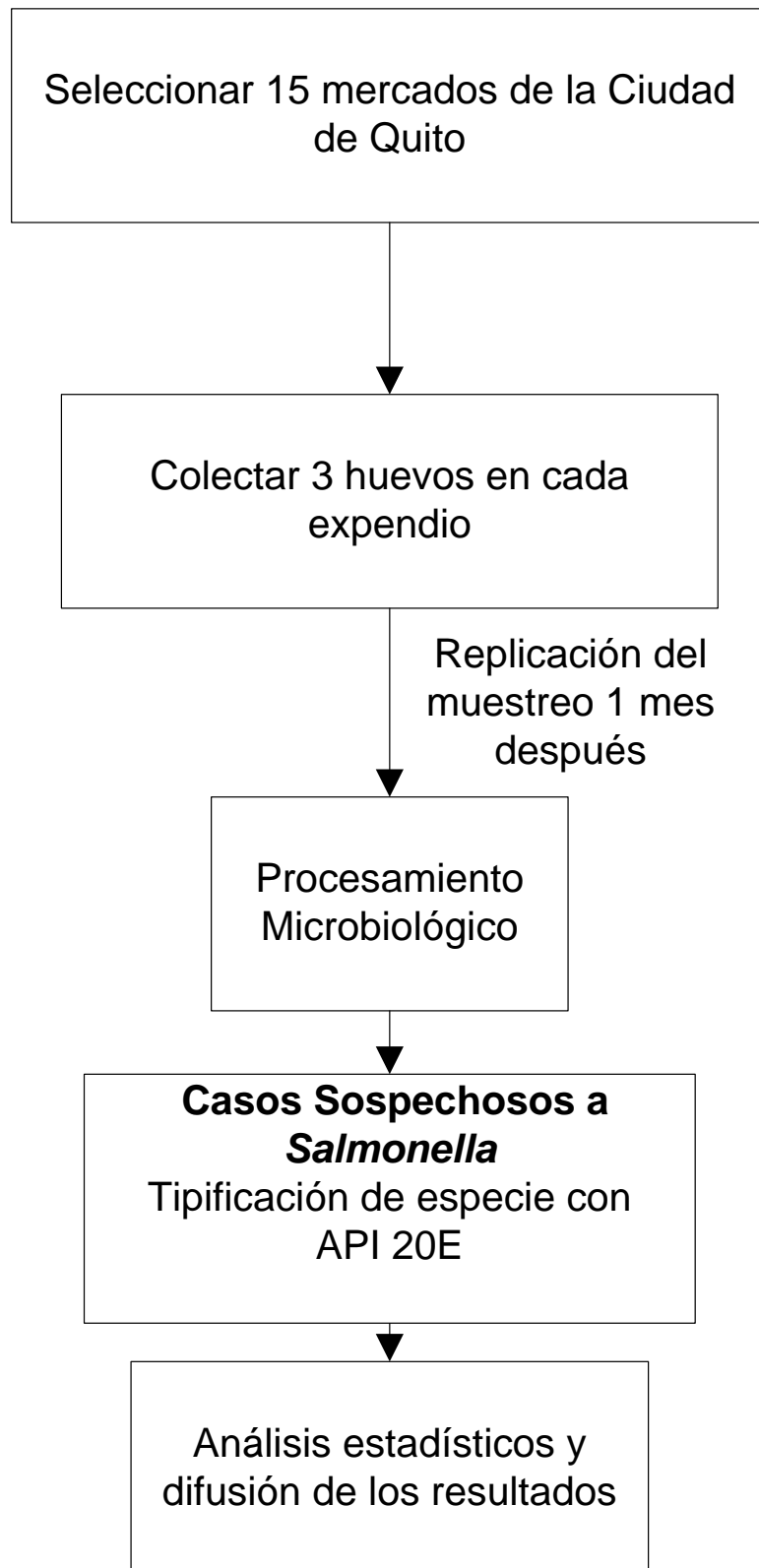
- (1) A partir de una colonia aislada del microorganismo se hizo una suspensión en 5 ml de solución salina estéril (0,9% de Cloruro de Sodio).
- (2) Se colocó la tira del API 20 E en su propia cámara húmeda de incubación. Para ello previamente se puso agua en los alvéolos de la cámara para proporcionar una atmósfera húmeda durante la incubación.
- (3) Se llenó con la suspensión de bacterias los pocillos de la tira, no la cúpula (cada pocillo tiene un tubo y una cúpula, parte aerobia), de todos los pocillos.
- (4) Se llenó la cúpula de los pocillos CIT, VP, GEL con la suspensión de bacterias.
- (5) Se cubrió con aceite mineral las cúpulas de los pocillos ADH, LDC, ODC, URE,  $H_2S$ , para obtener anaerobiosis.

- (6) Se incubó a 37°C durante 18-24 horas.
- (7) Tras la incubación se anotaron los resultados inmediatos de los que no requirieron ser revelados.
- (8) Se revelaron determinadas pruebas, para lo cual se añadió los siguientes reactivos:
- (a) **TDA:** Añadir una gota de  $F_2Cl_3$  10%
  - (b) **VP:** Añadir una gota del reactivo VP1 (KOH al 40%) y una gota del reactivo VP2 (*alfa-naftol*).
  - (c) **IND:** Añadir una gota de reactivo de Kovac o Dimetilamino Cinamaldehido.
- (9) **Interpretación:** La lectura de los resultados se llevó a cabo por la comparación de los colores de cada pocillo con los datos de lectura, y anotando el resultado como positivo o negativo de acuerdo a la tabla N° 5. Del conjunto de reacciones y resultados se obtiene un perfil numérico de 7 cifras. Los pocillos están separados en grupos de tres: en total tenemos 7 grupos de tres tubos o triplete (el test número 21 corresponde al test de la oxidasa). Para obtener el perfil numérico de 7 cifras, a cada pocillo se le dará el valor 0, 1, 2 ó 4, de acuerdo a los siguientes criterios: si la reacción es negativa se pone 0, si la reacción es positiva se pone: 1 si es el primer pocillo de un triplete, 2 si es el segundo, 4 si es el tercero. Se suman los valores de cada triplete, con las sumas de los siete tripletes se obtiene un código de 7 cifras. Este código se busca en la tabla de identificación la especie en el catálogo del API o se carga en el programa informático de API (apiweb™ bioMerieux).

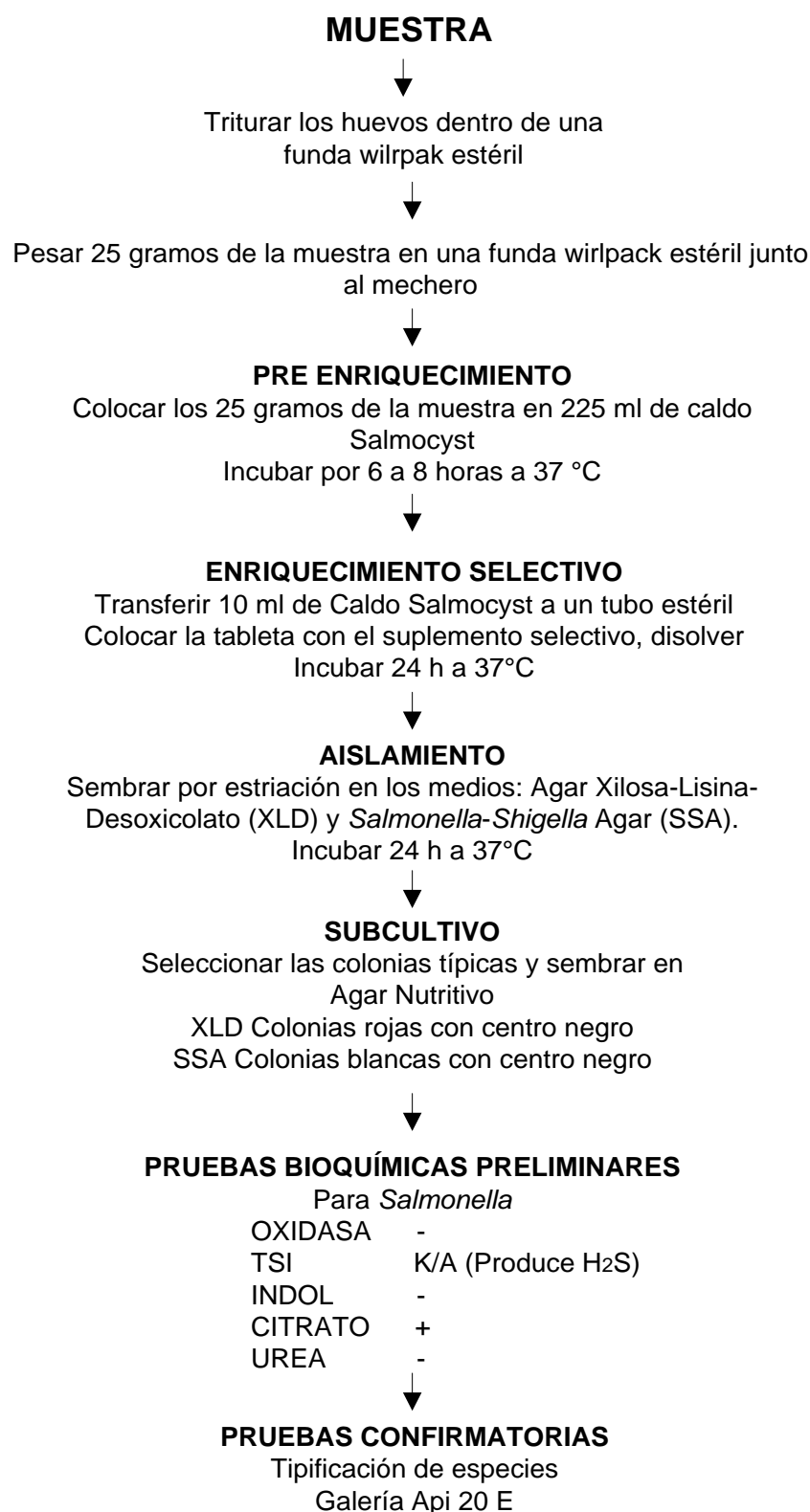
**Tabla 5. Tabla de lectura para la revelación de resultados de API 20E.**

<b>Prueba</b>	<b>Reacción / Enzimas</b>	<b>Negativo</b>	<b>Positivo</b>
<b>ONPG</b>	Beta-galactosidasa	Sin color	Amarillo
<b>ADH</b>	Arginina deshidrolasa	Amarillo	Rojo o naranja
<b>LDC</b>	Lisina descarboxilasa	Amarillo	Rojo o naranja
<b>ODC</b>	Ornitina descarboxilasa	Amarillo	Rojo o naranja
<b>CIT</b>	Utilización del citrato	Verde turquesa	Azul oscuro
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Producción de H <sub>2</sub> S	Sin precipitado negro	Precipitado negro
<b>URE</b>	Ureasa	Amarillo	Rojo o naranja
<b>TDA</b>	Triptófano desaminasa	Amarillo	Marrón – rojo
<b>IND</b>	Producción de indol	Amarillo	Anillo rosa– rojo
<b>VP</b>	Producción de acetoina (Voges-Proskauer)	Sin color	Rosa-rojo
<b>GEL</b>	Gelatinasa	Sin difusión de pigmento	Difusión de pigmento
<b>GLU</b>	Fermentación/oxidación de glucosa	Azul o verde	Amarillo
<b>MAN</b>	Fermentación/oxidación de manitol	Azul o verde	Amarillo
<b>INO</b>	Fermentación/oxidación de inositol	Azul o verde	Amarillo
<b>SOR</b>	Fermentación/oxidación de sorbitol	Azul o verde	Amarillo
<b>RHA</b>	Fermentación/oxidación de ramnosa	Azul o verde	Amarillo
<b>SAC</b>	Fermentación/oxidación de sacarosa	Azul o verde	Amarillo
<b>MEL</b>	Fermentación/oxidación de melobiosa	Azul o verde	Amarillo
<b>AMY</b>	Fermentación/oxidación de amigdalina	Azul o verde	Amarillo
<b>ARA</b>	Fermentación/oxidación de arabinosa	Azul o verde	Amarillo
<b>OX</b>	Citocromo oxidasa	Azul o verde	Amarillo

**Fuente:** Manual del API 20E, bioMerieux S.A, 2010.



**Fig 7. Esquema del estudio experimental**



**Fig 8. Flujograma del análisis microbiológico**

(Modificado del Manual de Laboratorio de Microbiología de Alimentos de Sonia Zapata Mena, USFQ, 2011)

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS

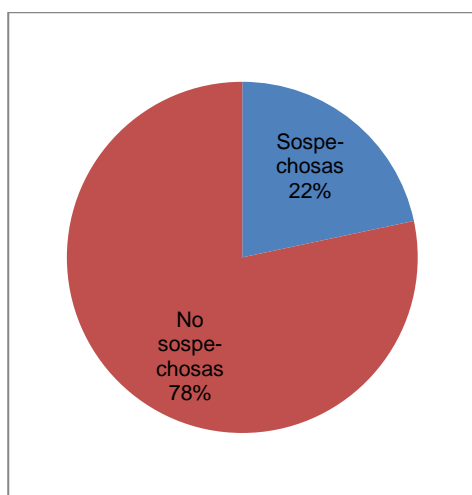
#### 1. Resultados de los análisis microbiológicos:

Se analizaron microbiológicamente 94 muestras de huevos, 47 en el primer muestreo y 47 en el estudio de replicación. Cada muestra constó de tres huevos, con un total de 282 huevos analizados.

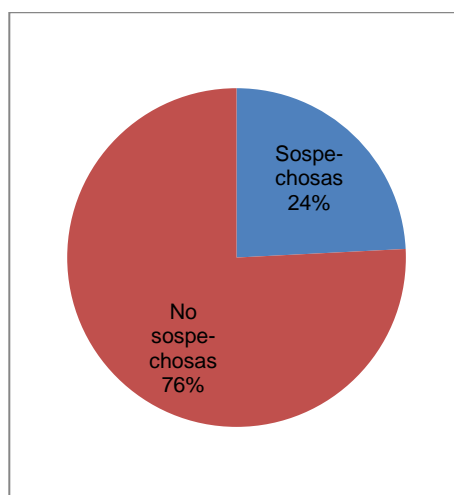
##### a) Resultados de las siembras en los medios de cultivo.

En los medios SSA y XLD, en los 2 muestreos se encontraron 39 colonias sospechosas provenientes de 25 muestras: 21 colonias en el primero y 18 colonias en el segundo, respectivamente (Fig. 9 y 10).

De las 39 colonias sospechosas y crioconservadas, 4 no crecieron en la resiembra en Agar Nutritivo, por lo que fueron descartadas. Las restantes 35 colonias fueron sometidas a las pruebas bioquímicas confirmatorias para *Salmonella*.



**Fig 9. Porcentaje de muestras sospechosas en el 1er muestreo**



**Fig 10. Porcentaje de muestras sospechosas en el 2do muestreo**

**b) Resultados de la pruebas bioquímicas preliminares.**

**Tabla 6. Resultados de la pruebas bioquímicas preliminares del primer muestreo**

N°	# Muestra	Código	# Aislado	TSI	SIM			Urea	Citrato
					SH <sub>2</sub>	Indol	Movilidad		
1	1	M01-E01-#1	1	K/K	-	-	-	-	+
	1	M01-E01-#1	2	K/K	-	-	-	-	+
2	2	M11-E01-#1	1	K/A	-	+	+	-	-
	2	M11-E01-#1	2	K/A	-	+	+	-	-
3	9	M03-E01-#1	1	K/K	-	-	+	-	-
4	13	M14-E03-#1	1	K/A	-	-	+	+	+
	13	M14-E03-#1	2	K/A	-	-	+	+	+
5	20	M07-E02-#1	1	K/K	-	-	-	-	-
6	28	M13-E02-#1	1	K/K	-	-	+	-	-
	28	M13-E02-#1	2	A/A	-	-	+	-	-
7	30	M12-E01-#1	1	K/K	-	-	+	-	+
8	32	M12-E03-#1	1	K/K	-	-	-	-	-
	32	M12-E03-#1	2	K/K	-	-	+	-	-
9	33	M12-E04-#1	1	K/A	-	-	+	-	+
10	34	M12-E05-#1	1	K/A+SH <sub>2</sub>	-	+	+	+	-
11	37	M12-E08-#1	1	K/K+SH <sub>2</sub>	+	-	+	+	+
	37	M12-E08-#1	2	K/K+SH <sub>2</sub>	+	-	-	+	+
12	41	M12-E12-#1	1	K/K	-	-	+	-	+
	41	M12-E12-#1	2	K/K	-	-	+	-	+
13	44	M15-E03-#1	1	K/K	-	-	+	-	+
	44	M15-E03-#1	2	K/K	-	-	+	-	+

**Tabla 7. Resultados de la pruebas bioquímicas preliminares del segundo muestreo**

N°	# Muestra	Código	# Aislado	TSI	SIM			UREA	Citrato
					SH <sub>2</sub>	Indol	Movilidad		
1	3	M02-E01-#2	1	A/A	-	-	+	-	-
	3	M02-E01-#2	2	A/A	-	+	+	-	+
2	7	M02-E04-#2	1	A/A	-	-	+	-	-
3	10	M03-E02-#2	1	A/A	-	-	+	-	-
4	16	M04-E03-#2	1	A/A	-	-	+	-	-
	16	M04-E03-#2	2	A/A	-	-	+	-	-
5	19	M07-E01-#2	1	A/A	-	-	+	-	+
	19	M07-E01-#2	2	K/K	-	-	+	-	+
6	28	M13-E02-#1	1	K/A	-	+	+	-	-
7	26	M10-E05-#2	1	K/K	-	-	+	-	+
8	36	M12-E07-#2	1	K/K	-	-	+	-	+
	36	M12-E07-#2	2	K/K	-	-	+	-	+
9	41	M12-E12-#2	1	K/K	-	-	-	-	+
	41	M12-E12-#2	2	K/K	-	-	+	-	-
10	43	M15-E02-#2	1	A/A	-	-	+	-	-
11	44	M15-E03-#2	1	K/K	-	-	+	-	-
12	45	M09-E01-#2	1	K/K	-	-	+	-	-
	45	M09-E01-#2	2	K/K	-	-	+	-	-

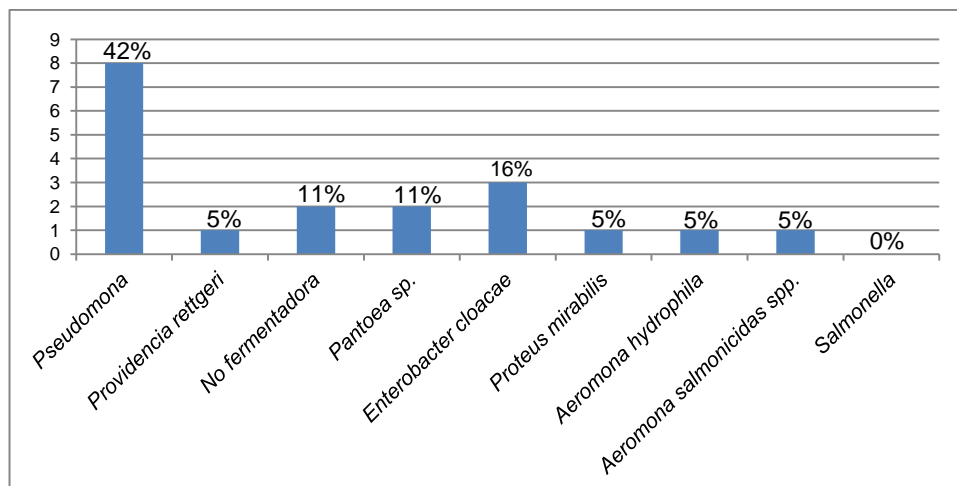


**c) Resultados de las Pruebas Bioquímicas Confirmatorias (Galería API 20E):**

De las 35 colonias sospechosas, se analizaron 21 cepas que, en las pruebas bioquímicas preliminares, cumplían con al menos 4 parámetros sugestivos para *Salmonella* spp. Ninguna de estas colonias perteneció al género *Salmonella* spp., pero se evidenció la presencia de otros microorganismos, los cuales están descritos en la Tabla 8.

**Tabla 8. Resultados de las Pruebas Bioquímicas Confirmatorias (Galería API 20E)**

# Muestra	Mercado	Código	Género/especie	% Probabilidad Según API 20E
1	Guamaní	M01-E01-#1	<i>Pseudomana oryzihabitans</i>	76,6
13	Calderón	M14-E03-#1	<i>Providencia rettgeri</i>	99,9
20	Central	M07-E02-#1	No fermentadora	
30	Iñaquito	M12-E01-#1	<i>Pantoea</i>	51,2
33	Iñaquito	M12-E04-#1	<i>Enterobacter cloacae</i>	95,1
44	Carapungo	M15-E03-#1	No fermentadora	
37	Iñaquito	M12-E08-#1	<i>Proteus mirabilis</i>	99,9
41	Iñaquito	M12-E12-#1	<i>Pseudomona fluorescens/putida</i>	80
41	Iñaquito	M12-E12-#1	<i>Burkholderia cepacia</i>	100
3	Las Cuadras	M02-E01-#2	<i>Enterobacter cloacae</i>	85
7	Las Cuadras	M02-E04-#2	<i>Aeromona hydrophila</i>	59,3
10	Chiriyacu	M03-E02-#2	<i>Enterobacter cloacae</i>	85
16	Magdalena	M04-E03-#2	<i>Pantoea sp.</i>	96,2
19	Central	M07-E01-#2	<i>Pseudomona aureginosa</i>	72
26	San Roque	M10-E05-#2	<i>Pseudomona oryzihabitans</i>	76,6
36	Iñaquito	M12-E07-#2	<i>Pseudomona oryzihabitans</i>	76,6
41	Iñaquito	M12-E12-#2	<i>Pseudomona fluorescens/putida</i>	54,4
43	Carapungo	M15-E02-#2	<i>Aeromona salmonicidas spp.</i>	71,7
44	Carapungo	M15-E03-#2	No fermentadora	
45	Cotocollao	M09-E01-#2	<i>Pseudomona oryzihabitans</i>	76,6

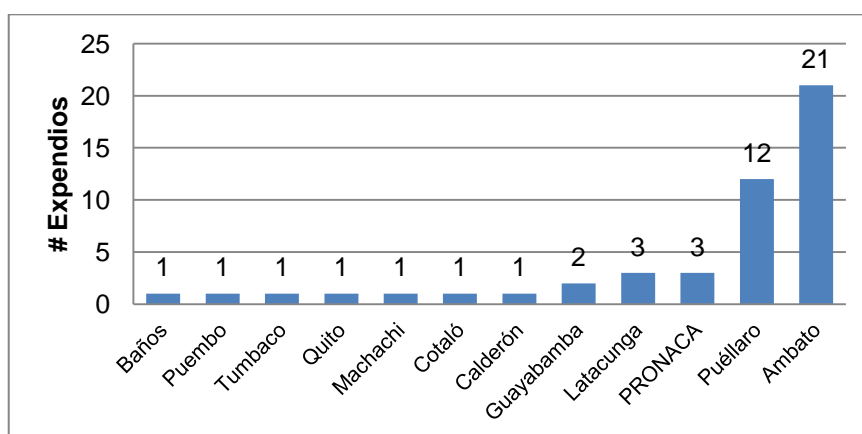


**Fig 11. Bacterias provenientes de los huevos colectados en los mercados de Quito, identificadas por API 20E.**

## 2. Resultados de las encuestas

De los 47 sitios donde se realizó el muestreo, 8 no respondieron a la encuesta, por lo cual no se los tomó en cuenta en los siguientes porcentajes.

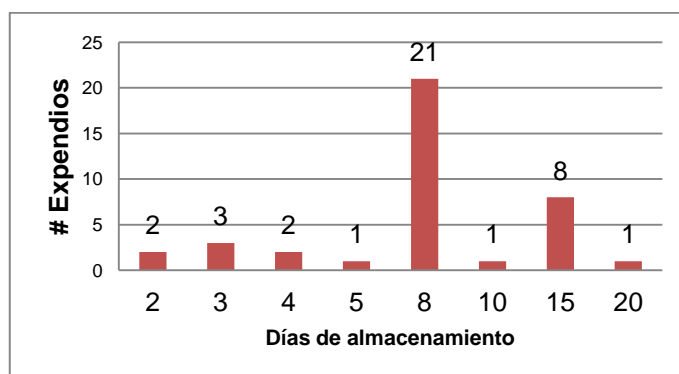
- a) **Lugares de Procedencia de los huevos:** De 39 vendedores de huevos el 44% expende huevos de Ambato y el 25% de Puéllaro.



**Fig 12. Lugares de Procedencia de los Huevos**

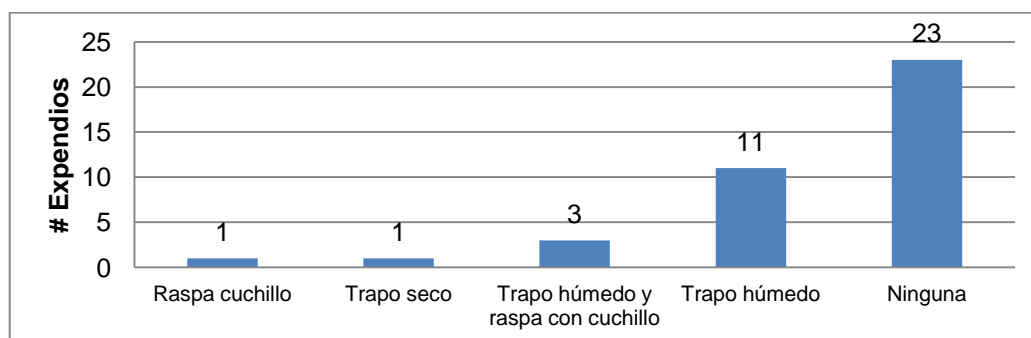
- b) **Transporte y almacenamiento de los huevos:** En todos los casos los huevos fueron transportados y mantenidos a temperatura ambiente (entre 15°C y 28°C aproximadamente).

c) **Tiempo de almacenamiento:** El rango de tiempo de almacenaje de los huevos fue de 2 a 20 días. El 54% de los expendios mantiene los huevos hasta 8 días y el 20% hasta por 15 días.



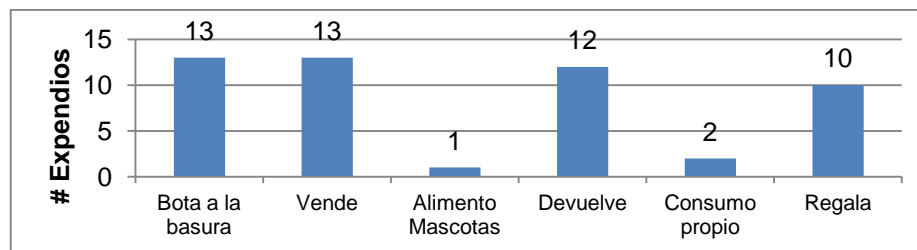
**Fig 13. Tiempo de almacenamiento de los huevos**

d) **Métodos de limpieza de los huevos:** El 59% no realiza ningún tipo de limpieza, el 28% de los vendedores limpia los huevos con trapo húmedo y en menor porcentaje limpian las impurezas con cuchillo o trapos secos.



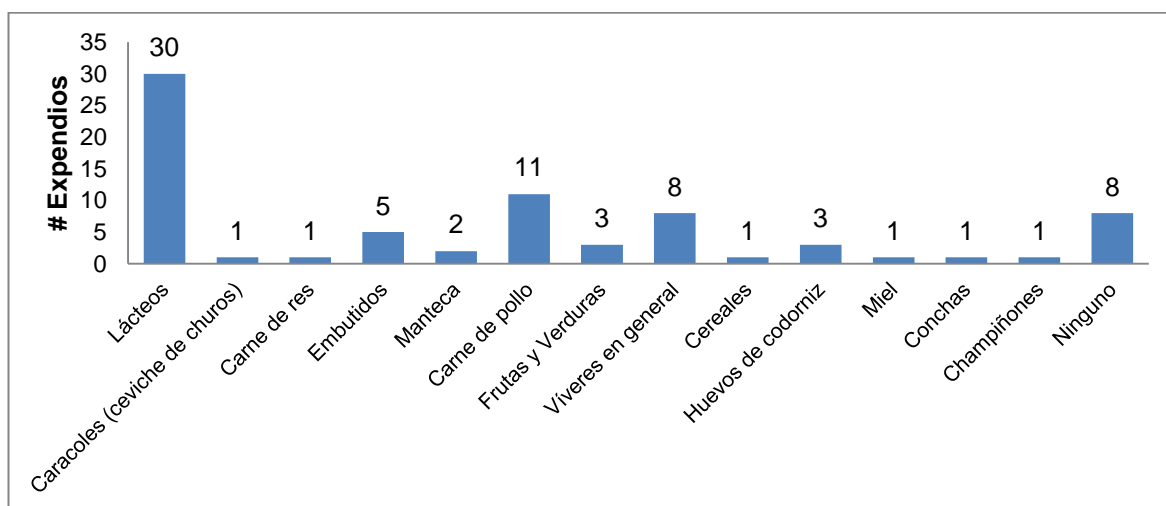
**Fig 14. Métodos de limpieza de los huevos**

e) **Destino de los huevos dañados o defectuosos:** El 25% bota los huevos defectuosos a la basura, otro 25% los vende principalmente a panaderías, el 20% los regala y el 24% los cambia al proveedor. Mientras que apenas el 4% los usa para su consumo propio y el 2% los utiliza como alimento para mascotas.



**Fig 15. Destino de los huevos dañados o defectuosos**

f) **Otros productos que se comercializan:** En los expendios de huevos principalmente se expenden lácteos (40%), seguidos de la carne de pollo (14%) y víveres en general (11%).



**Fig 16. Otros productos que se comercializan en los sitios de venta de huevos**

## CAPÍTULO V

### DISCUSIÓN

La investigación no demostró la presencia de *Salmonella* spp. en huevos, pese a que las muestras fueron sometidas a protocolos microbiológicos que favorecen el desarrollo selectivo de *Salmonella* a partir de muestras de alimentos. En estudios similares realizados en Perú, Argentina, Colombia y Cuba, no se encontraron serotipos del género *Salmonella* importantes en Salud Pública, pero se identificaron cepas no tipificables, específicas de especie (*S. gallinarum* principalmente) y otras nada conocidas en brotes de salmonelosis (*Salmonella djugu*, *S. mbandaka* y *S. zioria*) (Levano et. al, 2001; Franseschi, 1996; Leyva et. al, 1996). Por otro lado, en Chile y México se ha reportado una presencia muy baja de *Salmonella enteritidis* en huevos (1 en 1081 y 1 en 400 huevos, respectivamente) (Pozo et al, 2000; Mancera et. al, 2005). En estudios ejecutados en la Unión Europea en huevos individuales y pools se reportó la presencia de *Salmonella* entre el 0 y el 6.1% (Wallace, 2007; Betancort et. al, 2010, ECDC, 2010).

La presencia de *Salmonella* en huevos y ovoproductos es muy variable y podría estar influenciada por el número de muestras analizadas, condiciones de transporte, almacenamiento, manipulación y procesamiento.

En el Ecuador, hay escasos estudios de salmonelosis y ninguno ha sido orientado a la detección de *Salmonella* en huevos (Laboratorio de Alimentos de la Unidad Municipal de Salud Centro, 2012, Dirección Provincial de Salud de Pichincha, 2012; MSP, 2012; Vasco, 2012).

*Salmonella* es una bacteria de difícil cultivo y compite con otros miembros de la familia Enterobacteriaceae provenientes del medioambiente, heces fecales y la manipulación, que dificultan su desarrollo en los medios de

cultivo (INEN, 2009). En este estudio se evidenció el crecimiento de bacterias no salmocíticas en medios de cultivo selectivos diferenciales para *Salmonella*, las cuales a pesar de no ser patógenas tienden a dañar la calidad del huevo para su consumo. Las bacterias encontradas fueron *Pseudomona* spp., *Enterobacter cloacae*, *Pantoea* spp., *Proteus mirabilis*, *Providencia rettgeri* y *Burkholderia cepacia*. También se encontraron *Aeromona hydrofila* y *A. salmonicidas* spp., las cuales se han descrito como causantes de diarreas transmitidas por alimentos incluyendo los huevos como fuente de contaminación (Ghenghesh et al., 2008), y también se las ha encontrado en infecciones de heridas y en enfermedades sistémicas oportunistas (Murray, 2009).

En las visitas de campo y la información recopilada en las encuestas se evidenció que la gran mayoría de los vendedores de huevos (39%) desconoce la procedencia de este producto y muy pocos llevan registros de sus proveedores, por lo que no pueden exigir el cumplimiento de los criterios estipulados por las Normas INEN para huevos y ovoproductos (1973:2011) que son de carácter obligatorio a los productores directos, dificultando también posibles estudios de trazabilidad.

En todos los casos los huevos fueron mantenidos a temperatura ambiente durante el transporte y almacenamiento, lo cual hace que estos estén más expuestos a la contaminación ambiental y a la proliferación acelerada de microorganismos, afectando la calidad del producto. Varios estudios recomiendan mantener los huevos a 4.4 °C o temperaturas más bajas para que los huevos permanezcan inocuos y de buena calidad hasta 3 semanas si se manipulan apropiadamente (USDA, 2012).

La mayoría de los expendios venden huevos frescos, pues los mantienen para la venta hasta por 8 días (45%), en menor medida hasta por 15 días y en un caso hasta por 20 días. Sin embargo, es necesario que los consumidores conozcan la fecha de caducidad del huevo para prevenir toxiinfecciones asociadas al consumo de huevos pericados.

En cuanto a la limpieza de los huevos cerca de la mitad de los expendios

encuestados afirmaron que no realizan ningún tipo de tratamiento, mientras que otros limpiaban las impurezas con raspado externo o un trapo húmedo. Este último tipo de manejo puede perjudicar la calidad microbiológica del huevo al remover la cutícula de la cáscara y ser una puerta de entrada para que se contamine el huevo por el paso de microorganismos a través de las porosidades de la cáscara (Begazo, 2007).

Los huevos rotos o defectuosos se destinan a diferentes tipos de manejo como: botar, regalar, vender y/o devolver y en pocos casos para el consumo propio. Los huevos en este estado son más propensos a la contaminación y a la degradación, por lo que no es recomendable que sean empleados para el consumo y se debe evitar su utilización en la alimentación y desecharse de manera inocua (FAO, 2007).

También se verificó que el 11% vende únicamente huevos y el porcentaje restante vendía otros productos como: lácteos, carnes de aves, embutidos, conchas, churros, frutas, verduras, entre otros productos que pueden producir contaminación cruzada (FAO/OMS, 2005).

Pese a que en las encuestas y observaciones de campo se evidenciaron varios factores de riesgo para la contaminación de los huevos, no se dieron resultados positivos a *Salmonella*, pudiéndose inferir que su incidencia es baja por lo que no fue detectada, posiblemente por mejoras en los sistemas de producción, desinfección de huevos o vacunación con la cepa 9R en algunas granjas avícolas que proveen huevos al área urbana. Es importante comprender que este estudio no afirma la ausencia total de *Salmonella* en los huevos vendidos en la ciudad de Quito, pues es un estudio inicial y se recomienda un aumento en el número de muestras analizadas para futuras investigaciones (Observaciones personales).

Sin duda, el huevo es uno de los alimentos básicos en la dieta de los ecuatorianos, cuyo consumo per cápita llega a las 140 unidades al año (Conave, 2011). A nivel mundial, los huevos han sido considerados parte importante en la transmisión de enfermedades, entre las principales están

la salmonelosis, campylobacteriosis, listeriosis y el virus de Norwalk (USDA, 2012; CDC, 2011). Es por ello, que los huevos deben ser considerados y monitoreados, pues los problemas ocasionados en la salud humana y animal generan cuantiosas pérdidas económicas e impactos en Salud Pública. Desafortunadamente, en el Ecuador no hay información relevante sobre los huevos como factor de riesgo en la transmisión de las enfermedades.

La Salmonelosis, según la OMS/OPS es una enfermedad que causa millones de casos en todo el mundo cada año, dando lugar a miles de muertes. Los cálculos de costo de salmonelosis humana en Estados Unidos llegaron a los 3000 millones de dólares en el 2011 (ERS/USDA, 2011).

Se estima que cerca del 40% de brotes de la enfermedad son por el consumo de huevos y ovoproductos contaminados (EFSA, 2008).

El control de la salmonelosis debe realizarse en todos los niveles y tanto las entidades públicas como los consumidores deben exigir inocuidad y calidad de los productos de origen animal.

Los resultados de esta investigación servirán para notificar a entidades relacionadas con Salud Pública y regulación de los mercados municipales, para contribuir con datos epidemiológicos e impulsar investigaciones periódicas y vigilancia sobre las ETAs de origen animal, donde el médico veterinario es parte fundamental en la prevención. Tungurahua, Pichincha y Cotopaxi, en dicho orden de importancia, son las provincias más implícitas en la producción del producto, las cuales podrían ser áreas donde se podrían encontrar respuestas a la relación de los huevos con la salmonelosis humana en nuestro medio.



## **CAPÍTULO VI**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

#### **A. Conclusión**

No se evidenció la presencia de *Salmonella* spp. en huevos frescos de gallina de 47 expendios encontrados en 15 mercados de la Ciudad de Quito. En los análisis microbiológicos de muestras sospechosas, se confirmó la presencia de otras especies bacterianas como: *Pseudomona* spp., *Enterobacter cloacae*, *Pantoea* spp., *Providencia rettgeri*, *Proteus mirabilis*, *Aeromona* spp. y *Burkholderia cepacia*.

#### **B. Recomendaciones**

Impulsar investigaciones periódicas y vigilancia de las ETAs de origen animal donde intervengan los médicos veterinarios zootecnistas.

Efectuar muestreos directamente en las granjas avícolas industriales a nivel cama; materiales de recolección y lugares de almacenamiento del huevo, realizando estudios comparativos a la presencia de *Salmonella* en otros alimentos de origen animal, como carne de aves, cerdo y bovino. Del mismo modo se recomienda realizar los estudios en huevos de aves de traspatio.

Debido a la contaminación con bacterias inespecíficas, se recomienda, en futuros estudios, desinfectar los huevos externamente antes de realizar análisis microbiológicos, según lo indica Wallace (2007).

## **ANEXOS**

## Anexo A. Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1973:2011. Huevos Comerciales y Ovoproductos. Requisitos Microbiológicos.

**6.1.2 Requisitos microbiológicos.** Los huevos frescos y ovoproductos deben cumplir con los requisitos microbiológicos establecidos en las tablas 4 y 5.

**TABLA 4. Requisitos microbiológicos de los huevos frescos.**

Parámetro	Limite por g/ml			
	n	c	m	M
Recuento aerobios mesófilos *	5	2	$10^4$	$5 \times 10^4$
E. coli ufc/g** externa.	5	2	<50	50
E. coli ufc/g* * interno	5	2	Ausencia	----
Salmonella spp en 25 g**	5	0	Ausencia	---
* Parámetros de vida útil del producto ** Parámetros de inocuidad del producto				

Donde:

- n = número de muestras por examinar
- c = número de muestras defectuosas que se acepta
- m = nivel de aceptación
- M = nivel de rechazo

**TABLA 5. Requisitos microbiológicos de los ovoproductos.**

Parámetro	Limite por g/ml			
	n	c	m	M
Recuento Aerobios Mesófilos *	5	2	$10^4$	$5 \times 10^4$
E. coli ufc/g* *	5	2	Ausencia	---
Salmonella spp en 25 g**	5	0	Ausencia	---
* Parámetros de vida útil del producto ** Parámetros de inocuidad del producto				

Donde:

- n = número de muestras por examinar
- c = número de muestras defectuosas que se acepta
- m = nivel de aceptación
- M = nivel de rechazo

## Anexo B. Medios de Cultivo Utilizados

### 1. Salmosyst® Caldo Base y Suplemento Selectivo (Merck)

**Modo de acción.-** Todos los microorganismos presentes en el material de la muestra se enriquecen durante un pre-enriquecimiento no selectivo en caldo base Salmosyst®. Después de la adición de los reactivos selectivos en forma de una tableta de Suplemento Selectivo Salmosyst®, se inhibe el crecimiento de los organismos acompañantes, pero *Salmonella* continúa creciendo.

**Composición de la Base de Caldo (g / litro).-** Peptona de caseína 5,0; peptona de carne 5,0; cloruro de sodio 5,0; carbonato de calcio 10,0. pH: 7,1± 0,2 a 25 ° C.

**Composición del Suplemento Selectivo (g / tableta).-** Tetrationato de potasio 0,2; bilis de buey 0,08; verde brillante 0,0007; carbonato de calcio 0,1.

**Preparación del Caldo Base.-** Disolver 25 g/litro, autoclavar (15 min a 121°C). A continuación se observa una precipitación blanca de carbonato de calcio que no afecta al rendimiento del caldo. Durante el almacenamiento del caldo el carbonato de calcio puede disolverse y conducir a un aumento mínimo en el pH.

#### Control de calidad (incluidos los suplementos)

Cepas testeadas	Crecimiento
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 14028	Bueno
<i>Salmonella dublin</i> ATCC 15480	Bueno
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Inhibida
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433	Inhibida

**2. BD XLD Agar (Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar).-** Es un medio moderadamente selectivo y de diferenciación para el aislamiento y la diferenciación de patógenos entéricos gram negativos (*Salmonella* y *Shigella*) de muestras clínicas y no clínicas. Es adecuado en especial para el aislamiento de la especie *Shigella*.

**Principios y explicación del procedimiento.-** XLD Agar es un medio selectivo y de diferenciación. Contiene extracto de levadura como fuente de nutrientes y vitaminas. Utiliza el desoxicolato de sodio como agente selectivo y, por consiguiente, inhibe los microorganismos gran positivos. La xilosa se incorpora en el medio dado que la fermentan prácticamente todos los entéricos, excepto *Shigella*, y esta propiedad hace posible la diferenciación de dicha especie. La lisina se incluye para permitir la diferenciación del grupo *Salmonella* de los organismos no patógenos, dado que, sin lisina, *Salmonella* fermentaría rápidamente la xilosa y no se distinguiría de las especies no patógenas. Cuando la *Salmonella* agota el suministro de xilosa, la lisina es atacada por la enzima lisina descarboxilasa, lo que genera un cambio a un pH alcalino que imita la reacción de *Shigella*. Para evitar el cambio similar en los organismos

coliformes positivos a la lisina, se añaden lactosa y sacarosa para producir ácido en exceso.

Para aumentar la capacidad de diferenciación de la fórmula, se incluye un sistema indicador de H<sub>2</sub>S, formado por tiosulfato sódico y citrato férrico amónico, para la visualización del ácido sulfhídrico producido, lo que origina la formación de colonias con centros de color negro. Los organismos no patógenos no productores de H<sub>2</sub>S no descarboxilan la lisina; por tanto, la reacción ácida producida por dichos organismos evita el oscurecimiento de las colonias, lo que sucede sólo con pH alcalino o neutro.

**Reactivos BD XLD agar.- Fórmula\*** por litro de agua purificada

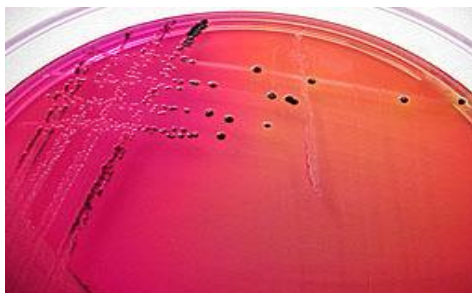
Xilosa	3,5 g
L-Lisina	5,0
Lactosa	7,5
sacarosa	7,5
Cloruro sódico	5,0
Extracto de levadura	3,0
Rojo fenol	0,08
Desoxicolato de sodio	2,5
Tiosulfato sódico	6,8
Citrato férrico de amonio	0,8
Agar	13,5

pH 7,4 ± 0,2

\*Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

**Resultados:** En la tabla se indica la morfología característica de las colonias:

Organismos	BD XLD Agar (Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar)
<i>E. coli</i>	Grandes, planos, de color amarillo. Puede haber algunas cepas inhibidas.
<i>Enterobacter/Klebsiella</i>	Mucoides, amarillos
<i>Proteus</i>	De rojo a amarillo. La mayoría de las cepas tienen centros de color negro.
<i>Salmonella</i> , positiva a H <sub>2</sub> S	De rojo a amarillo con centros de color negro.
<i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> , negativas a H <sub>2</sub> S	Rojo
<i>Pseudomonas</i>	Rojo
Bacterias gram positivas	Crecimiento escaso o nulo



**Apariencia de una colonia sugestiva de *Salmonella* en XLD**

**Fuente:** Grupo de estudio para la formación y docencia en enfermedades infecciosas y microbiología clínica (GEFOR)

**3. BD Salmonella Shigella Agar.-** BD Salmonella Shigella Agar o SS Agar (agar Salmonella-Shigella BD) es un medio selectivo y de diferenciación para el aislamiento de bacilos entéricos patógenos, en especial los pertenecientes al género *Salmonella*.

**Principios y Explicación del Procedimiento.-** El agar Salmonella-Shigella es una modificación del agar citrato desoxicolato descrito por Leifson. Se le considera un medio moderadamente selectivo según el nivel de inhibición de los microorganismos gram positivos y Enterobacteriaceae diferentes de *Salmonella* y *Shigella*, que inhibe por contenido de sales biliares, verde brillante y citratos.

En BD Salmonella Shigella Agar, la diferenciación de los organismos entéricos se logra mediante la incorporación de lactosa en el medio. Los organismos que fermentan lactosa producen ácido que, en presencia del indicador rojo neutro, propicia la formación de colonias de color rojo. Los organismos no fermentadores de lactosa forman colonias incoloras. Este último grupo incluye la mayoría de los patógenos intestinales, incluidas *Salmonella* y *Shigella*. El tiosulfato sódico y el citrato férrico permiten la detección de producción de ácido sulfhídrico, como lo demuestran las colonias con centros de color negro. Este medio se utiliza para el aislamiento primario de *Salmonella* a partir de muestras fecales humanas. Dado que existen medios más eficaces para el aislamiento de *Shigella*, no debe utilizarse para el aislamiento de este organismo.

**Reactivos BD Salmonella-Shigella Agar.-** Fórmula\* por litro de agua purificada

Extracto de carne bovina	5,0 g
Digerido pancreático de caseína	2,5
Digerido péptico de tejido animal	2,5
Lactosa	10,0
Sales biliares	8,5
Citrato sódico	8,5
Tiosulfato sódico	8,5
Citrato férrico	1,0
Rojo neutro	0,025
Agar	13,5
Verde brillante	0,330 mg

pH 7,2 ± 0,2

\*Ajustada y/o suplementada para satisfacer los criterios de rendimiento.

**Resultados.-** En la tabla se indica la morfología característica de las colonias:

Organismos	BD Salmonella Shigella Agar
<i>E. coli</i>	Crecimiento ligero, color rosa o rojo
<i>Enterobacter/Klebsiella</i>	Crecimiento leve, color rosa
<i>Proteus</i>	Incoloro, con centros blancos
<i>Salmonella</i>	Incoloro, generalmente con centro de color negro
<i>Shigella</i>	Incoloro
<i>Pseudomonas</i>	Crecimiento leve e irregular
Bacterias gram positivas	Ausencia de crecimiento



**Apariencia de una colonia sugestiva de *Salmonella* en SS**

**Fuente:** Grupo de estudio para la formación y docencia en enfermedades infecciosas y microbiología clínica (GEFOR)

**4. BD Triple Sugar Iron Agar (agar triple azúcar hierro BD).-** La aplicación original de la fórmula de TSI es como medio en tubo, con una base de tubo y un área inclinada. Permite la diferenciación de los organismos fermentadores de glucosa, lactosa y/o sacarosa, además de la detección de la producción de sulfuro de hidrógeno.

**Principios y explicación del procedimiento.-** El agar triple azúcar hierro contiene tres carbohidratos (glucosa, lactosa y sacarosa). Cuando dichos carbohidratos se fermentan, la producción resultante de ácido es detectada por el indicador rojo fenol. Se producen cambios de color: amarillo para la producción de ácido y rojo para la alcalinización. Dado que la lactosa y la sacarosa se encuentran presentes en concentraciones mucho más elevadas que la glucosa, la formación de ácido en la base del tubo se debe a dichos azúcares, mientras que la formación de ácido a partir de la glucosa es suprimida por la rápida oxidación de una pequeña cantidad de ácido en el área inclinada del tubo, lo que genera una reacción de pH neutro o alcalino cuando se fermenta sólo glucosa. La sacarosa añadida permite la exclusión de determinados organismos coliformes y las especies *Proteus* que pueden atacar la sacarosa, pero no la lactosa, en un período de incubación de 24 – 48 h. Con un pH neutro o alcalino, el ácido sulfhídrico (producido por el tiosulfato sódico) reacciona con la sal de amonio ferroso, lo que produce sulfuro de hierro de color negro. El cloruro sódico mantiene el equilibrio osmótico del medio.

**5. Agar Citrato de Simmons BD.-** Simmons Citrate Agar (agar citrato de Simmons) se utiliza para la diferenciación de bacterias gran negativas mediante la utilización de citrato.

**Principios del procedimiento.-** Los organismos capaces de utilizar el fosfato de amonio dihidrogenado y citrato sódico como las únicas fuentes de nitrógeno y carbón, respectivamente, crecerán en este medio y producirán una reacción alcalina, detectada por el cambio de color del indicador de azul de bromotimol de color verde (neutro) a azul (alcalino).

**6. SIM Medium (Sulfide-Indol-motility) BD.-** SIM Medium se utiliza

para diferenciar los bacilos entéricos por su producción de sulfuro, formación de indol y movilidad.

**Principios del procedimiento.-** Los elementos de SIM Medium posibilitan la determinación de tres actividades por las que se pueden diferenciar las bacterias entéricas. El tiosulfato sódico y el sulfato ferroso de amonio son indicadores de producción de ácido sulfhídrico. El sulfato ferroso de amonio reacciona con gas de H<sub>2</sub>S para producir sulfato ferroso, un precipitado de color negro. La peptona de caseína es rica en triptófano, que determinados microorganismos atacan, lo que da como resultado la producción de indol. El indol se detecta mediante la adición de reactivos químicos posteriormente al periodo de incubación. La detección de motilidad es posible gracias a la naturaleza semisólida del medio. Un crecimiento que se propague hacia el exterior a partir de la línea central de inserción de la muestra indica que el organismo de prueba es móvil.

**7. Urea agar base BD.-** Se utiliza para la diferenciación de organismos, en especial al grupo Enterobacteriaceae, según su producción de ureasa.

**Principios del procedimiento.-** Cuando los organismos utilizan la urea, se produce amoníaco durante la incubación, lo que hace la reacción de dichos medios alcalina y genera color rosa rojo. En consecuencia, la producción de ureasa puede detectarse mediante el cambio en el indicador rojo fenol.

**8. Oxidasa. Bactident® Oxidasa (Merck).** Esta prueba determina la presencia de la enzima citocromo-oxidasa. Todas las enterobacterias son negativas a la prueba de la oxidasa.

La zona reactiva de la tira contiene dicloruro de N,N-dimetil-1,4-fenilendiamonio 0,1 µmol y 1-naftol 1,0 µmol, los cuales permiten una evaluación colorimétrica de la actividad enzimática. Para la realización de la prueba se toma una colonia aislada del medio y se aplica la colonia sobre la zona reactiva. Al cabo de 20 a 60 segundos se compara la coloración de la tira con la escala colorimétrica. En el caso de los microorganismos citocromo oxidasa-positivos la zona cambia de color a azul o violeta azulado.

**9. BD Tryptic Soy Agar (agar nutritivo).-** BD Tryptic Soy Agar (agar de soja triptica BD), suministrado en frascos, es un medio de uso general completado parcialmente que, vertido en placas de Petri o tubos, favorece el crecimiento de microorganismos tanto no exigentes como moderadamente exigentes. En la microbiología clínica, no se utiliza para el aislamiento de patógenos a partir de muestras clínicas, pero puede ser utilizado para el cultivo de cepas bacterianas. Después de suplementarlo con sangre, se puede utilizar como medio de aislamiento primario en la microbiología clínica.



**Principios y explicación del procedimiento.-** La combinación de caseína y peptonas de soja hace al medio nutritivo, al suministrar nitrógeno orgánico, en especial aminoácidos y péptidos de cadena más larga. El cloruro sódico mantiene el equilibrio osmótico.

**10.BBL Infusión Cerebro Corazón (BHI).-** La infusión de cerebro y corazón BHI es un medio líquido de uso general utilizado para el cultivo de microorganismos exigentes y no exigentes, incluidas bacterias aerobias y anaerobias, a partir de diversas muestras clínicas y no clínicas.

**Principios del procedimiento.-** El caldo BHI es un medio de cultivo nutritivo tamponado que contiene infusiones de tejido de cerebro y corazón y peptonas para suministrar proteínas y otros nutrientes necesarios para favorecer el crecimiento de microorganismos exigentes y no exigentes.

**11.API® 20E (Biomériux).-** La galería API 20E es un sistema de identificación rápida para bacterias de la familia Enterobacteriaceae y otras bacterias gram negativas. Consta de 21 pruebas bioquímicas estandarizadas. Este sistema presenta las ventajas de ser rápida, eficaz y permitir realizar varias pruebas a la vez. Cada tira de API 20E contiene 20 microtubos o pocillos con distintos sustratos deshidratados. Cda tubo es un prueba bioquímica distinta. La prueba número 21, la oxidasa, se hace de forma independiente.

Cuando se utiliza esta galería las cartas de colores correspondientes a las pruebas negativas y positivas son las siguientes:



## Anexo C. Encuestas.

### 1. Hoja de Encuesta.

#### **DATOS DEL EXPENDIO DE HUEVOS**

Mercado # \_\_\_\_\_ Entrevistador \_\_\_\_\_  
Expendio # \_\_\_\_\_ Zona \_\_\_\_\_  
Fecha \_\_\_\_\_ Informante \_\_\_\_\_ Clave \_\_\_\_\_

#### **Preguntas al vendedor**

1. Nombre del/la propietario/a: \_\_\_\_\_
2. Número de teléfono: \_\_\_\_\_
3. Vende sus huevos: Al por mayor ☐ Al por menor ☐
4. ¿De dónde proceden los huevos?  
\_\_\_\_\_
5. Días de recepción de huevos: \_\_\_\_\_
6. Hora de recepción de huevos: \_\_\_\_\_
7. ¿Hace qué tiempo trajo los huevos para la venta?  
Hoy ☐ Ayer ☐ \_\_\_\_\_ días
8. ¿Cómo almacena los huevos?: \_\_\_\_\_  
Temperatura ambiente ☐ Refrigeración ☐ Canasta ☐  
Cubeta ☐ Funda ☐ Otros: \_\_\_\_\_
9. Selecciona los huevos antes de la venta:  
Si ☐ (siga a la pregunta 10) No ☐ (siga a la pregunta 11)  
↓
10. Cómo selecciona los huevos:  
Por tamaño ☐ Por color ☐  
Elimina los rotos ☐ Elimina los defectuosos ☐
11. ¿Limpia los huevos antes de la venta?  
Si ☐ (siga a la pregunta 12) No ☐ (siga a la pregunta 13)  
↓
12. ¿Cómo limpia los huevos?  
Con un trapo seco ☐ Con un trapo húmedo ☐  
Formol ☐ Cloro ☐ Otros ☐
13. ¿Hasta por cuánto tiempo almacena sus huevos para la venta?  
\_\_\_\_\_
14. ¿Qué hace con los huevos defectuosos o dañados?  
Los bota a la basura ☐ Los regala ☐ Da a los animales ☐  
Otros ☐ \_\_\_\_\_
15. Otros productos que allí se expenden: \_\_\_\_\_

#### **Observaciones:**

Código de la muestra:

M \_\_\_\_ E \_\_\_\_ # \_\_\_\_

Hora de la colección de huevos: \_\_\_\_\_

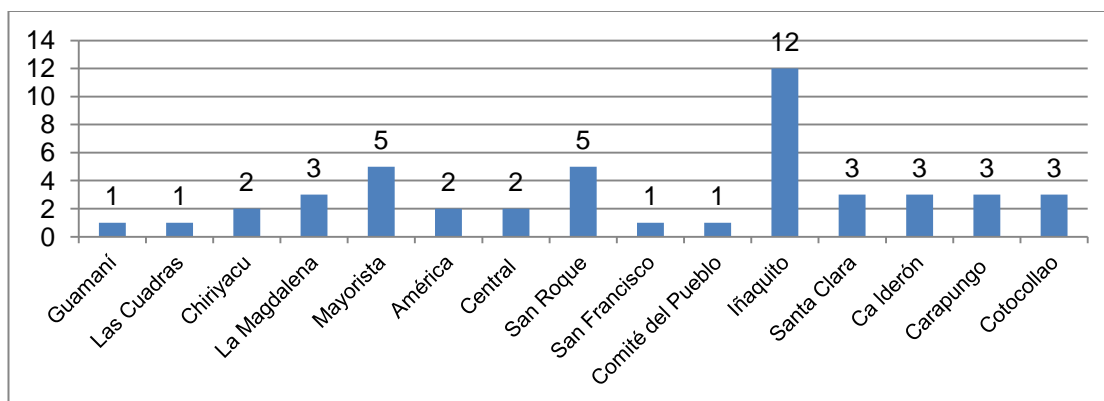
Otras observaciones: \_\_\_\_\_

## 2. Resultados de las encuestas:

a) **Número de expendios de huevos:** Se visitaron los 15 mercados seleccionados donde se encontraron 47 expendios en total. En promedio se encontraron 3 expendios por mercado, con excepción del mercado Iñaquito donde se hallaron 12 puestos de venta de huevos.

**Tabla 9. Número de expendios de huevos encontrados en los mercados de Quito, entre febrero y marzo del 2012.**

Zona Administrativa	Mercado	Número de expendios muestreados
Zona Quitumbe	Guamaní	1
	Las Cuadras	1
Zona Sur (Eloy Alfaro)	Chiriyacu	2
	La Magdalena	3
	Mayorista	5
Zona Centro (Manuela Sáenz)	América	2
	Central	2
	San Roque	5
	San Francisco	1
Zona Norte (Eugenio Espejo)	Comité del Pueblo	1
	Iñaquito	12
	Santa Clara	3
Zona Calderón	Calderón	3
	Carapungo	3
Zona la Delicia	Cotocollao	3
<b>Total</b>		<b>47</b>



**Fig 17. Número de expendios muestreados.**

b) **Encuestas:** Se realizaron encuestas en todos los sitios de venta de huevos. De los 47 dueños de los expendios 8 no respondieron a la encuesta. En la Tabla N°10 se detallan los resultados de las encuestas.

**Tabla 10. Datos de las encuestas realizadas a los expendedores de huevos de los mercados seleccionados para el estudio, febrero del 2012.**

#	Mercado #	Código	Venta por mayor/ menor	Número cubetas	Procedencia	Granja	Días de almacenaje	Limpieza	Selección	Destino dañados y/o defectuosos	Otros productos de venta
1	Guamaní	M01-E01-#1	Por mayor y menor	700	Ambato	Familia Sereno Sánchez	8	Trapo húmedo	Elimina rotos defectuosos	Bota basura	Ninguno
2	Comité del Pueblo	M11-E01-#1	Por menor	1000	Baños	Avícola El Abayón	8	Ninguna	Elimina rotos defectuosos	Bota basura	Lácteos, frutas, cereales
3	Las Cuadras	M02-E01-#1	Por menor	50	Ambato	No Sabe	4	Trapo húmedo	Ninguna	Devuelve	Lácteos, gaseosas
4	Mayorista	M05-E01-#1	Por menor	500	Ambato	No Sabe	20	Trapo húmedo	Elimina rotos defectuosos	Bota basura	Ninguno
5	Mayorista	M05-E02-#1	Por menor	800	Ambato	Avícola El Oro	15	Ninguna	Elimina rotos defectuosos	Bota basura	Ninguno
6	Mayorista	M05-E03-#1	Por menor	1200	Ambato	Avícola El Oro	15	Ninguna	Elimina rotos defectuosos	Bota a la basura y vende	Ninguno
7	Mayorista	M05-E04-#1	Por mayor y menor	600	Puellaro	No Sabe	10	Trapo húmedo	Ninguna	Devuelve	Pollo
8	Mayorista	M05-E05-#1	Por menor	200	Ambato, Latacunga	No Sabe	8	Trapo húmedo/Raspa cuchillo	Elimina rotos defectuosos	Bota basura	Gaseosas, Lácteos, snacks
9	Chiriyacu	M03-E01-#1	Por mayor y menor	580	Puambo	Avícola El Oro	15	Ninguna	Ninguna	Vende y/o regala	Mariscos
10	Chiriyacu	M03-E02-#1	Por menor	2000	Ambato	Cotaló	8	Raspa cuchillo	Ninguna	Vende panaderías	Ninguno
11	Calderón	M14-E01-#1	Por menor	40	Guayabamba	No Sabe	8	Ninguna	Elimina rotos defectuosos	Bota basura	Lácteos, huevos de codorniz
12	Calderón	M14-E02-#1	Por menor	100	Puellaro	No Sabe	8	Ninguna	Elimina rotos defectuosos-Tamaño	Bota basura	Caracoles (ceviche de churos)
13	Calderón	M14-E03-#1	Por menor	60	Puellaro	No Sabe	15	Ninguna	Elimina rotos defectuosos	Bota basura-alimento mascota	Lácteos
14	Magdalena	M04-E01-#1	Por menor	30	Ambato	No Sabe	8	Ninguna	Elimina rotos defectuosos	Devuelve, vende panaderías	Lácteos, gaseosas
15	Magdalena	M04-E02-#1	Por mayor y menor	200	Ambato	No Sabe	8	Trapo seco	Ninguna	Bota y regala	Lácteos, gaseosas
16	Magdalena	M04-E03-#1	Por menor	30	Ambato	No Sabe	8	Trapo húmedo	Tamaño	Bota a la basura y vende a panaderías	Lácteos, miel

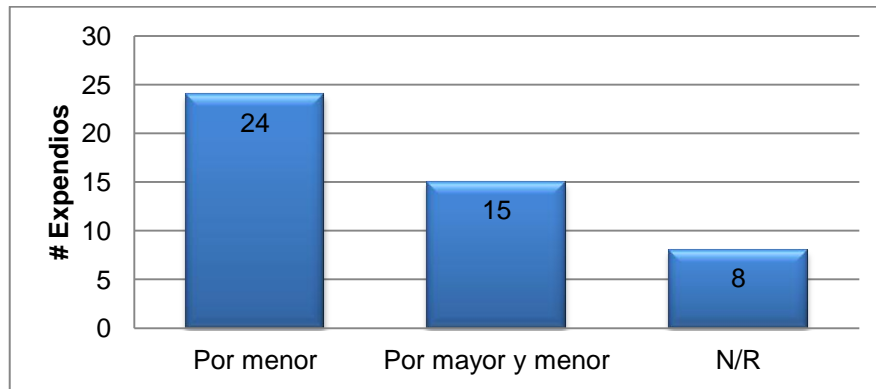
#	Mercado #	Código	Venta por mayor/ menor	Número cubetas	Procedencia	Granja	Días de almacenaje	Limpieza	Selección	Destino dañados y/o defectuosos	Otros productos de venta
17	América	M06-E01-#1	Por menor	8	Tumbaco, Puellaro, Guayabamba	No Sabe	15	Trapo húmedo	Ninguna	Devuelve	Viveres
18	América	M06-E02-#1	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	Viveres
19	Central	M07-E01-#1	Por mayor y menor	7	Puellaro	Granja Señores Torres	8	Ninguna	Ninguna	Vende	Lácteos
20	Central	M07-E02-#1	Por menor	10	Puellaro	Granja Señores Torres	8	Ninguna	Tamaño	Vende y/o regala	Lácteos
21	San Francisco	M08-E01-#1	Por mayor y menor	1000	Ambato, Latacunga, PRONACA	Huambaló, Santa Teresita, Velasteguí, Pronaca	5	Ninguna	Tamaño	Vende a panaderías	Ninguno
22	San Roque	M10-E01-#1	Por mayor y menor	1000	Ambato	No Sabe	15	Ninguna	Elimina rotos defectuosos- Tamaño	Vende y/o regala	Lácteos
23	San Roque	M10-E02-#1	Por mayor y menor	500	Ambato	Granja La Dolorosa	8	Ninguna	Tamaño	Vende y/o regala	Lácteos, gaseosas
24	San Roque	M10-E03-#1	Por mayor y menor	700	Ambato	Avícola El Oro	8	Ninguna	Ninguna	Vende y/o regala	Solo huevos
25	San Roque	M10-E04-#1	Por menor	200	Ambato	Avícola El Oro	8	Ninguna	Tamaño	Vende	Ninguno
26	San Roque	M10-E05-#1	Por menor	50	Ambato	Granja Cecilita	2	Ninguna	Ninguna	Bota basura	Frutas, verduras, lácteos, vegetales
27	Santa Clara	M13-E01-#1	Por menor	8	Quito	Depósito "El Vecino"	3	Trapo húmedo	Tamaño y color	Lleva a su casa	Lácteos
28	Santa Clara	M13-E02-#1	Por menor	10	PRONACA	PRONACA	15	Ninguna	Ninguna	Devuelve	Lácteos
29	Santa Clara	M13-E03-#1	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	Carne, lácteos, embutidos
30	Iñaquito	M12-E01-#1	Por menor	120	Ambato	No Sabe	8	Ninguna	Ninguna	Cambia	Viveres en general
31	Iñaquito	M12-E02-#1	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	Lácteos, pollos
32	Iñaquito	M12-E03-#1	Por mayor y menor	350	Ambato	Avícola El Oro	3	Trapo húmedo y raspa con cuchillo	Tamaño	Devuelve	Lácteos, quesos

Tabla10. (cont.)

#	Mercado #	Código	Venta por mayor/ menor	Número cubetas	Procedencia	Granja	Días de almacenaje	Limpieza	Selección	Destino dañados y/o defectuosos	Otros productos de venta
33	Iñaquito	M12-E04-#1	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	Lácteos, pollos
34	Iñaquito	M12-E05-#1	Por menor	30	Ambato	Avícola El Oro	8	Trapo húmedo	Tamaño	Cambia	Polo, Champiñones
35	Iñaquito	M12-E06-#1	Por menor	10	Machachi	Granja	8	Trapo húmedo	Tamaño	Regala	Pollo, lácteos
36	Iñaquito	M12-E07-#1	Por mayor y menor	300	Ambato	Avícola El Oro	8	Trapo húmedo y raspa con cuchillo	Ninguna	Devuelve, regala	Pollo, lácteos
37	Iñaquito	M12-E08-#1	Por menor	15	Puellaro	No Sabe	8	Ninguna	Ninguna	Consumo propio	Pollo, lácteos
38	Iñaquito	M12-E09-#1	Por menor	30	Puellaro	No Sabe	8	Ninguna	Ninguna	Regala	Pollo, huevos codorniz
39	Iñaquito	M12-E10-#1	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	Viveres en general, lácteos
40	Iñaquito	M12-E11-#1	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	Pollo
41	Iñaquito	M12-E12-#1	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	Pollo, lácteos, huevos de codorniz
42	Carapungo	M15-E01-#1	Por mayor y menor	150	Puellaro	No Sabe	3	Trapo húmedo	Ninguna	Devuelve y/o regala	Embutidos, lácteos
43	Carapungo	M15-E02-#1	Por mayor y menor	200	Ambato, Latacunga	Avipol	4	Ninguna	Ninguna	Regala	Embutidos, lácteos
44	Carapungo	M15-E03-#1	Por menor	15	Calderón, Puellaro	No Sabe	2	Trapo húmedo	Tamaño	Bota basura-cambia	Frutas, verduras, lácteos, vegetales
45	Cotocollao	M09-E01-#1	Por mayor y menor	100	Puellaro	No Sabe	15	Ninguna	Ninguna	Vende panaderías	Embutidos, lácteos, manteca, pollo
46	Cotocollao	M09-E02-#1	Por mayor y menor	120	Puellaro	No Sabe	8	Ninguna	Ninguna	Devuelve	Embutidos, lácteos, manteca
47	Cotocollao	M09-E03-#1	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	N/R	Embutidos, lácteos

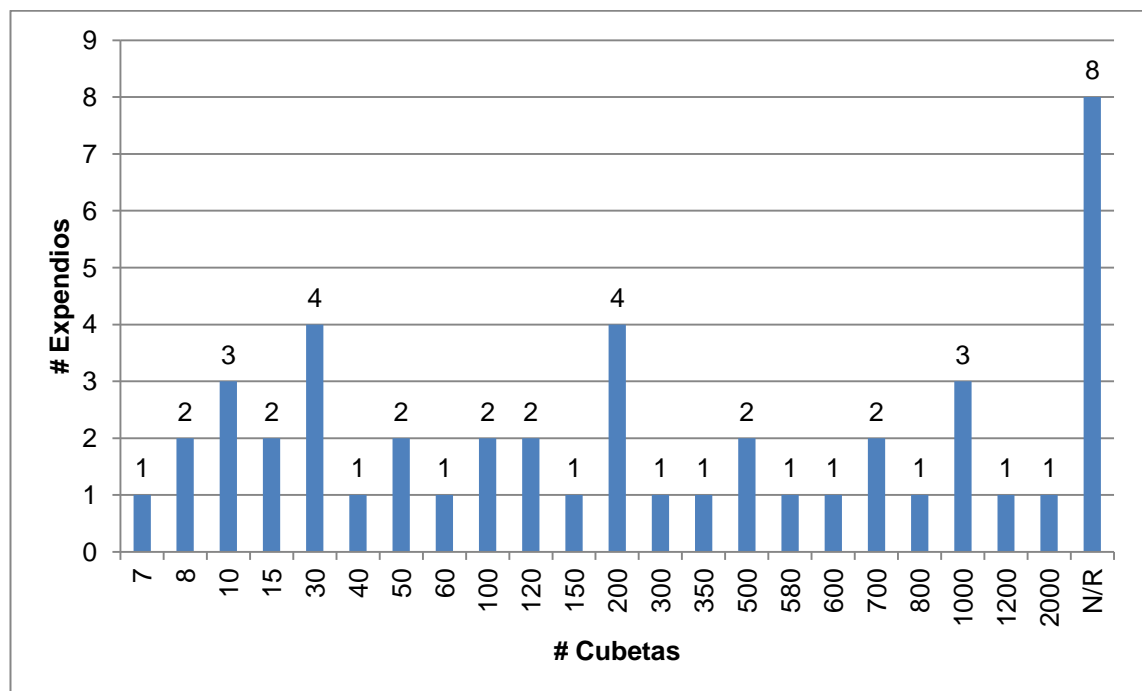
Tabla 10. (cont.)

- c) **Tipo de venta de huevos:** De los 47 mercados, 24 venden los huevos al por menor, 15 al por menor y mayor y 8 no respondieron.



**Fig 18. Tipo de Venta de Huevos en los Expendios**

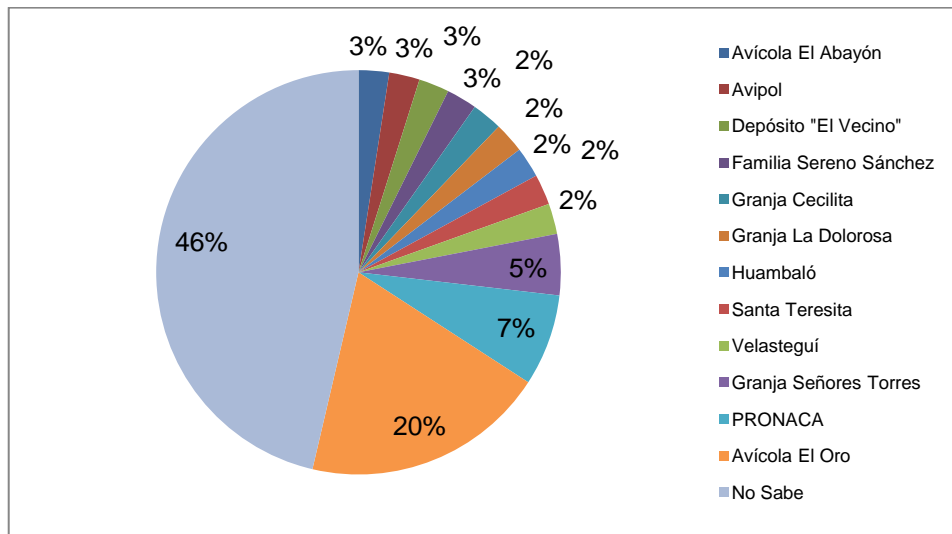
- d) **Número de cubetas de huevos que se venden en los expendios:** El número de cubetas que se comercializan en cada expendio fue muy variable, con un valor mínimo de 7 cubetas en el caso del Mercado Central y un máximo de 2000 cubetas en Chiriyacu.



**Fig 19. Número de cubetas de huevos que se venden en los expendios**

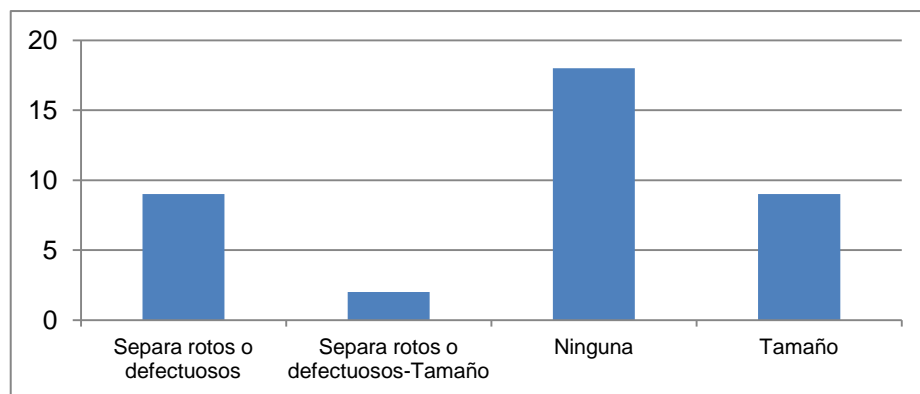
- e) **Granjas de procedencia de los huevos:** Cerca de la mitad (39%) de los sitios encuestados desconoce las granjas de procedencia de los huevos, el 16% no respondió y entre los sitios más representativos

estuvieron la Avícola El Oro con el 17% y PRONACA con el 6%.



**Fig 20. Granjas de Procedencia de los Huevos**

f) **Selección de los huevos:** El 39% no selecciona los huevos, pues estos ya vienen seleccionados. En algunos expendios los clasifican por el tamaño, el color o separa los huevos rotos o defectuosos.



**Fig 21. Selección de los huevos**



## Anexo D. Resultados de las siembras en el primer muestreo, en los medios SSA y XLD.

**Tabla 11. Resultados de las siembras en el primer muestreo, en los medios SSA y XLD.**

#	Mercado #	Código	Fecha recolección	XLD	SSA	Sospechosa
1	Guamaní	M01-E01-#1	03/02/2012	Colonias amarillas	Colonias rojas	No
2	Comité del Pueblo	M11-E01-#1	04/02/2012	Colonias transparentes	Colonias transparentes	Si
3	Las Cuadras	M02-E01-#1	04/02/2012	Colonias transparentes	Colonias transparentes	Si
4	Mayorista	M05-E01-#1	04/02/2012	Colonias transparentes	Colonias transparentes	Si
5	Mayorista	M05-E02-#1	04/02/2012	Colonias transparentes	Colonias transparentes	Si
6	Mayorista	M05-E03-#1	04/02/2012	Colonias transparentes	Colonias transparentes	Si
7	Mayorista	M05-E04-#1	04/02/2012	Colonias amarillas	Colonias blancas con centro negro	Si
8	Mayorista	M05-E05-#1	04/02/2012	Colonias negras	Colonias negras	Si
9	Chiriyacu	M03-E01-#1	04/02/2012	Colonias transparentes	Colonias blancas pequeñas	Si
10	Chiriyacu	M03-E02-#1	04/02/2012	Colonias transparentes	Colonias blancas	Si
11	Calderón	M14-E01-#1	05/02/2012	Colonias transparentes	Colonias blancas	Si
12	Calderón	M14-E02-#1	05/02/2012	Colonias rojas con centro negro	Colonias blancas con centro negro	Sí
13	Calderón	M14-E03-#1	05/02/2012	Colonias rosadas	Colonias amarillas	Sí
14	Magdalena	M04-E01-#1	05/02/2012	Colonias transparentes	Colonias transparentes	Sí
15	Magdalena	M04-E02-#1	05/02/2012	Colonias transparentes	Colonias transparentes	Sí
16	Magdalena	M04-E03-#1	05/02/2012	No creció	No creció	No
17	América	M06-E01-#1	12/02/2012	No creció	No creció	No
18	América	M06-E02-#1	12/02/2012	No creció	No creció	No
19	Central	M07-E01-#1	12/02/2012	Colonias rojas grandes	Colonias amarillas grandes	Si
20	Central	M07-E02-#1	12/02/2012	No creció	No creció	No
21	San Francisco	M08-E01-#1	12/02/2012	No creció	No creció	No
22	San Roque	M10-E01-#1	12/02/2012	No creció	No creció	No
23	San Roque	M10-E02-#1	12/02/2012	No creció	No creció	No
24	San Roque	M10-E03-#1	12/02/2012	No creció	No creció	No
25	San Roque	M10-E04-#1	12/02/2012	No creció	No creció	No
26	San Roque	M10-E05-#1	12/02/2012	No creció	Colonia blanca pequeña	Si
27	Santa Clara	M13-E01-#1	12/02/2012	No creció	No creció	No
28	Santa Clara	M13-E02-#1	12/02/2012	No creció	No creció	No
29	Santa Clara	M13-E03-#1	12/02/2012	No creció	No creció	No
30	Iñaquito	M12-E01-#1	12/02/2012	No creció	No creció	No
31	Iñaquito	M12-E02-#1	12/02/2012	No creció	No creció	No
32	Iñaquito	M12-E03-#1	12/02/2012	No creció	No creció	No
33	Iñaquito	M12-E04-#1	12/02/2012	No creció	No creció	No
34	Iñaquito	M12-E05-#1	12/02/2012	No creció	No creció	No
35	Iñaquito	M12-E06-#1	12/02/2012	No creció	No creció	No
36	Iñaquito	M12-E07-#1	12/02/2012	Colonias rojas	Colonias blancas	Si
37	Iñaquito	M12-E08-#1	12/02/2012	No creció	No creció	No
38	Iñaquito	M12-E09-#1	12/02/2012	No creció	No creció	No
39	Iñaquito	M12-E10-#1	12/02/2012	No creció	No creció	No
40	Iñaquito	M12-E11-#1	12/02/2012	No creció	No creció	No
41	Iñaquito	M12-E12-#1	12/02/2012	Colonias rojas grandes	Colonias grandes blanquecinas	Si
42	Carapungo	M15-E01-#1	14/02/2012	Colonias amarillas	No creció	No
43	Carapungo	M15-E02-#1	14/02/2012	No creció	No creció	No
44	Carapungo	M15-E03-#1	14/02/2012	Colonias rojas pequeñas	No creció	Sí
45	Cotocollao	M09-E01-#1	14/02/2012	Colonias rojas pequeñas	No creció	Sí
46	Cotocollao	M09-E02-#1	14/02/2012	No creció	No creció	No
47	Cotocollao	M09-E03-#1		No creció	No creció	No

**Anexo E. Resultados de las siembras en el segundo muestreo, en los medios SSA y XLD.**

**Tabla 12. Resultados de las siembras en el segundo muestreo, en los medios SSA y XLD.**

#	Mercado #	Código	XLD	SSA	SOSPECHO-SA
1	Guamaní	M01-E01-#2	Colonias rojas y amarillas	Colonias amarillas	Si
2	Comité del Pueblo	M11-E01-#2	Colonias transparentes	Colonias transparentes	Si
3	Las Cuadras	M02-E01-#2	No creció	No creció	No
4	Mayorista	M02-E01-#2	No creció	No creció	No
5	Mayorista	M02-E02-#2	Colonias amarillas	No creció	No
6	Mayorista	M02-E03-#2	No creció	No creció	No
7	Mayorista	M02-E04-#2	No creció	No creció	No
8	Mayorista	M02-E05-#2	Colonias rojas	No creció	Si
9	Chiriyacu	M03-E01-#2	Colonias rojas	No creció	Si
10	Chiriyacu	M03-E02-#2	No creció	No creció	No
11	Calderón	M14-E01-#2	No creció	No creció	No
12	Calderón	M14-E02-#2	No creció	No creció	No
13	Calderón	M14-E03-#2	Colonias rojas	Colonias amarillas	Si
14	Magdalena	M04-E01-#2	No creció	No creció	No
15	Magdalena	M04-E02-#2	No creció	No creció	No
16	Magdalena	M04-E03-#2	No creció	No creció	No
17	América	M06-E01-#2	No creció	No creció	No
18	América	M06-E02-#2	No creció	No creció	No
19	Central	M07-E01-#2	No creció	No creció	No
20	Central	M07-E02-#2	Colonias rojas	No creció	Si
21	San Francisco	M08-E01-#2	No creció	No creció	No
22	San Roque	M10-E01-#2	No creció	No creció	No
23	San Roque	M10-E02-#2	No creció	No creció	No
24	San Roque	M10-E03-#2	Colonias rojas	No creció	Si
25	San Roque	M10-E04-#2	No creció	No creció	No
26	San Roque	M10-E05-#2	No creció	No creció	No
27	Santa Clara	M13-E01-#2	Colonias amarillas	Colonias rojisas	No
28	Santa Clara	M13-E02-#2	No creció	No creció	No
29	Santa Clara	M13-E03-#2	Colonias amarillas	Colonias rojisas	No
30	Iñaquito	M12-E01-#2	No creció	Colonias amarillas	Si
31	Iñaquito	M12-E02-#2	Colonias rojas	Colonias blancas	Si
32	Iñaquito	M12-E03-#2	Colonias amarillas	Colonias rojas	No
33	Iñaquito	M12-E04-#2	Colonias amarillas	Colonias rojas	No
34	Iñaquito	M12-E05-#2	No creció	No creció	No
35	Iñaquito	M12-E06-#2	No creció	No creció	No
36	Iñaquito	M12-E07-#2	Colonias amarillas, colonias rojas con centro negro	Colonias blancas con centro negro	Si
37	Iñaquito	M12-E08-#2	No creció	No creció	No
38	Iñaquito	M12-E09-#2	No creció	No creció	No
39	Iñaquito	M12-E10-#2	No creció	No creció	No
40	Iñaquito	M12-E11-#2	No creció	No creció	No
41	Iñaquito	M12-E12-#2	Colonias amarillas	Colonias rojas	No
42	Carapungo	M15-E01-#2	No creció	No creció	No
43	Carapungo	M15-E02-#2	No creció	No creció	No
44	Carapungo	M15-E03-#2	No creció	No creció	No
45	Cotocollao	M09-E01-#2	No creció	No creció	No
46	Cotocollao	M09-E02-#2	No creció	No creció	No
47	Cotocollao	M09-E03-#2	No creció	No creció	No

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

### BIBLIOGRAFÍA

1. Agrocalidad. (2010). Resolución N° 047. Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro–Agrocalidad.
2. Amer, I. y Von Spetch, M. (1999). Incidencia de *Salmonella* en huevos de gallina y mayonesa artesanal. *Rev. Ciencia Tecnol.* 2:43-49.
3. Begazo, S. (2007). “Manejo Del Huevo Fértil: Efectos Sobre La Calidad Del Pollo Bb”. *Memorias Del Congreso Nacional.* AMEVEA.
4. CMFPM (2011). Oficio N° 000738. Listado de Mercados del Distrito Metropolitano de Quito. Coordinación de Mercados, Ferias y Plataformas Municipales. Quito, receptado el 12 de julio de 2011.
5. Dirección Provincial de Salud de Pichincha. (2012). Reporte de los casos de Enfermedades Transmitidas por Agua y Alimentos en la Provincia de Pichincha durante 2011 y 2012. Quito, receptado en mayo del 2012.
6. FAO (2004). *Glosario de Biotecnología para la Agricultura y la Alimentación.* Zahid A., Hughes H., Porceddu E., Nicholas F. Roma: Organización de Las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
7. FAO/OMS. (2005). *Evaluaciones de riesgos de Salmonella en huevos y pollos para asar. Resumen interpretativo.* Roma: Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación Organización Mundial de la Salud. Serie de evaluación de riesgos microbiológicos.
8. Ghenghesh et al. (2008). *Aeromonas-Associated Infections in Developing Countries. Review.* Khalifa Sifaw Ghenghesh, Salwa F. Ahmed, Rania Abdel El-Khalek, Atef Al-Gendy, John Klena. *Journal Infect Developing Countries*; 2(2): 81-98.
9. Gantois et. al (2009). *Mechanisms of egg contamination by Salmonella Enteritidis. Review article.* Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Gast R, Humphrey T & Immerseel F. *Federation of European Microbiological Societies. FEMS Microbiol. Rev* 33. 718–738.
10. García, L. et.al, MSP (2009). *Guía Operativa Para la Investigación Epidemiológica de Enfermedades Transmitidas por agua y alimentos (ETA) (Casos, Brotes Y Epidemias).* Quito: Ministerio De Salud Pública Del Ecuador. pp. 15-19.

11. INEN, (2009). Norma Técnica Ecuatoriana. NTE-INEN 1529-15:2009. Control Microbiológico De Los Alimentos. *Salmonella*. Método De Detección. Primera edición. Instituto Ecuatoriano de Normalización.
12. INEN, (2011). Norma Técnica Ecuatoriana NTE-INEN 1973:2011. Huevos comerciales y ovoproductos. Requisitos. Primera revisión. Instituto Ecuatoriano de Normalización. Quito-Ecuador.
13. Keller LH, Benson CE, Krotec K & Eckroade RJ, (1995). *Salmonella* Enteritidis colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. Infect Immun 63: 2443–2449.
14. Laboratorio de Alimentos de la Unidad Municipal de Salud Centro, (2012). Ciudad de Quito. Reportes de presencia de *Salmonella* en mayonesa y carne de pollo en los años 2011 y 2012. Oficio receptado en mayo del 2012.
15. Mancero, A., López, D., Tenorio, V., Vázquez, J, Ontiveros, M., Duran, S. (2005). Identificación de *Salmonella* Enteritidis en huevo para consumo en la ciudad de México. Universidad Autónoma de México., número 002. Red de Revistas científicas de América Latina y El Caribe, España y Portugal. Mayo/Agosto año/vol. 43. pp. 229-237.
16. MERCK (2010). Salmosyst® Selective Supplement. Merck Microbiology Manual 12th Edition.
17. Miyamoto, T., Baba, E., Tanaka, T., Sasai, K., Fukata, T. y Arakawa, A., (1997). *Salmonella* Enteritidis contamination of eggs from hens inoculated by vaginal, cloacal and intravenous routes. Avian Dis 41: 296–303.
18. MSP/EPI 2 (2008). Tasa de Incidencia Anual de Salmonellosis por año y según región ECUADOR 1998 a 2008. Sistema Integrado de Vigilancia Epidemiológica (SIVE). Ministerio de Salud Pública.
19. Murray, P. (2009). Microbiología médica. Patrick R. Murray, Ken S. Rosenthal, Michael A. Pfaller. 6° ed. Madrid: Elsevier Mosby.
20. Murray, Patrick R. (1999). Manual of clinical microbiology. 7th ed. Washington, D.C. ASM Press.
21. Okamura, M., Kamijima, Y., Miyamoto, T., Tani, H., Sasai, K. & Baba, E. (2001a) Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens. Avian Dis 45: 61–69.
22. Okamura, M., Miyamoto, T., Kamijima, Y., Tani, H., Sasai, K. y Baba, E. (2001b) Differences in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in intravaginally inoculated hens and in vitro adherences to vaginal explants between *Salmonella* Enteritidis and other *Salmonella* serovars. Avian Dis 45: 962–971.

23. Quinn (2011). Veterinary microbiology and microbial disease. 2da. Edición. P.J. Quinn, B.K. Markey, F.C. Leonard, E. S. FitzPatrick, S. Fanning, P.J. Hartigan. Blackwell Publishing Ltd. pp. 273,274.
24. Ray, B. (2010). Fundamentos de microbiología de los alimentos / Bibek Ray, Arun Bhunia. 4º ed. México: McGraw-Hill. Cap. 25. pp. 202-207.
25. Timoney, J., Shivaprasad, H., Baker, R. y Rowe, B. (1989) Egg transmission after infection of hens with *Salmonella* Enteritidis phage type 4. Vet Rec 125: 600–601.
26. Valencia (2007). Vademécum Avícola 2007. Pullorosis, Tifoidea Aviar, Infecciones Paratifoideas. pp. 274-280. Edifarm. Quito-Ecuador.
27. Vasco, G., (2012). Microorganismos Causantes de las Enfermedades Diarréicas en el Sur de Quito. G. Vasco; R. Atherton; E. Bermeo; J. Eisenberg; G. Trueba. Memorias del II Encuentro Nacional de Investigación de Enfermedades Infecciosas y Medicina Tropical. Quito-Ecuador.
28. Vieira, AR. et al. (2009). WHO Global Foodborne Infections Network Country Databank. A resource to link human and non-human sources of Salmonella. ISVEE Conference, Durban, South Africa.
29. Wallace, H. (2007). Bacteriological Analytical Manual Chapter 5. *Salmonella*.
30. Yousef, Ahmed E. Microbiología de los alimentos manual de laboratorio. Zaragoza: Acribia, (2003). Cap. 9 *Salmonella*. pp 181,182.
31. Zapata, S. (2010). Microbiología de Alimentos, Manual de Laboratorio. Quito: Universidad San Francisco de Quito.

## NET-GRAFÍA

1. Blast Genome (2012). *Salmonella enterica*. Dendograma. Recuperado el 05 de junio de 2012. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/152>
2. Castañeda, S., Gómez, R., Triana, L., Ferro, C.J., Vásquez, E. (2004). Comparación de los métodos para detección de *Salmonella* en alimentos: Método tradicional vs. Método de PCR en tiempo real. Secretaría Distrital de Salud. Disponible en: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S012108072011000200008&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S012108072011000200008&script=sci_arttext&tlng=pt)
3. CDC (2011). CDC Estimates of Foodborne Illness in the United States. National Center for Emerging & Zoonotic Infectious Diseases Division of Foodborne Waterborne, and Environmental Diseases. Febrero 2011. Disponible online: [www.cdc.gov/foodborneburden](http://www.cdc.gov/foodborneburden).
4. CONAVE (2011). Corporación Nacional de Avicultores (CONAVE). Recuperado el 05 de junio de 2012. Disponible en: <http://www.conave.org/respuestas.php?pagina=7>
5. ECDC (2011). European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control; The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010; EFSA Journal 2012; 10 (3):2597. [442pp.] doi:10.2903/j.efsa.2012.2597. Disponible en: [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal)
6. ERS/USDA (2011). Data Foodborne Illness Cost Calculator. Recuperado el 03 de junio del 2012. Disponible en: <http://webarchives.cdlib.org/sw1rf5mh0k/http://www.ers.usda.gov/Data/FoodborneIllness/>
7. FAO (2007). Código de Prácticas de higiene para los huevos y productos del huevo. CAP/RCP 15-1976. Revisión 2007. Disponible en: [http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/73/CXP\\_015s.pdf](http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/73/CXP_015s.pdf)
8. Fransechi, M. y Barrios, H. (1996). *Salmonella*: Separando el mito de la realidad. Recuperado en junio del 2012. Disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/693/69370201.pdf>
9. Ibáñez, C., (2007). *Salud pública y algo más*. Recuperado el 14 de abril de 2012. Disponible en: [http://www.madrimasd.org/blogs/salud\\_publica/2007/02/28/60163](http://www.madrimasd.org/blogs/salud_publica/2007/02/28/60163)
10. Lanza, O. (2003). Codex Alimentarius y seguridad alimentaria. Recuperado el 14 de abril de 2012. Disponible en: <http://www.ops.org.bo/textocompleto/nnu22721.pdf>
11. Lévano, G. y López, C. (2001). Evaluación de la presencia de *Salmonella* en huevos frescos utilizando el medio xilosa-Lisina-Tergitol 4 (XLDT4). Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Rev. Ciencia e Investigación Vol IV (1). Disponible en: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/ciencia/v04\\_n1/eval\\_presen.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVRevistas/ciencia/v04_n1/eval_presen.pdf)

12. Leyva, V., Valdés, E., Cisneros, E. y Pérez O. (1996) Determinación de *Salmonella* y enterobacterias totales en huevos frescos de gallina. Recuperado en junio del 2012. Disponible en: [http://www.bvs.sld.cu/revistas/ali/vol10\\_2\\_96/ali03296.htm](http://www.bvs.sld.cu/revistas/ali/vol10_2_96/ali03296.htm)
13. MSP (2007). Epidemiología. Ministerio de Salud Pública del Ecuador. Recuperado el 13 de Junio de 2012. Disponible en: [http://www.msp.gob.ec/dps/azuay/index.php?option=com\\_content&view=article&id=13&Itemid=44](http://www.msp.gob.ec/dps/azuay/index.php?option=com_content&view=article&id=13&Itemid=44)
14. MSP (2012). Gaceta Epidemiológica Ecuador SIVE-Alerta 2012. Gaceta Nº 1 SEMANAS EPIDEMIOLÓGICAS 1 – 8. Disponible en: <http://issuu.com/mspecuador/docs/gacetaepidemiologica/1>
15. NCBI (2012). Taxonomía de *Salmonella*. National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. USA. Recuperado el 05 de junio de 2012. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=590>
16. OIE (2005). Instructivo Técnico para la Detección de *Salmonella* spp. móviles según Metodología Tradicional OIE. Gobierno de Chile. Ministerio de Agricultura SAG. Código IT-LAB-24-v01. Recuperado en mayo del 2012. Disponible en: <http://www.sag.gob.cl/OpenDocs/asp/pagVerRegistro.asp?argInstanciaId=56&argRegistroId=1257>
17. OIE (2008a). Trad. Manual de la OIE sobre animales terrestres. Salmonelosis. Capítulo 2.9.9. Recuperado en mayo del 2012. Disponible en: [http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es\\_2008/2.09.09.%20Salmonelosis.pdf](http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.09.09.%20Salmonelosis.pdf)
18. OIE (2008b). Trad. Manual de la OIE sobre animales terrestres. Pullorosis y Tifosis aviar. Capítulo 2.3.11. Disponible en: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health\\_standards/tahm/2.03.11.%20Pulorosis%20y%20tifosis%20aviar.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.03.11.%20Pulorosis%20y%20tifosis%20aviar.pdf)
19. OPS/OMS, INEC, & MSP. (2011). Indicadores Básicos De Salud, Ecuador 2011. Quito. Disponible en: [http://new.paho.org/ecu/index.php?option=com\\_docman&task=doc\\_download&gid=390&Itemid=](http://new.paho.org/ecu/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=390&Itemid=)
20. PANAFTOSA (2005). Consejo Panamericano contra la Fiebre Aftosa-Panaftosa (2005). Conferencia hemisférica de vigilancia y prevención de la influenza aviar y reunión ministerial de agricultura y salud sobre planes nacionales de vigilancia y prevención de la influenza aviar. Recuperado en marzo de 2012. Disponible en: [http://www.panaftosa.org.br/Comp/Eventos/Aviar/Progr\\_Conferencia\\_esp.pdf](http://www.panaftosa.org.br/Comp/Eventos/Aviar/Progr_Conferencia_esp.pdf)
21. Porwollik, S. (2002). Characterization of *Salmonella enterica* Subspecies I Genovars by Use of Microarrays. S. Porwollik, E. F. Boyd, C. Choy, P. Cheng, L. Florea, E. Proctor, and M. McClelland. Journal of Bacteriology. 2004 September; 186(17): 5883–5898. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC516822/>

22. Pozo, C., Gonzáles, V., Martínez, V., Prat, S, Fernández, A., Fica, A. y Fernández, J. (2000). Determinación de *Salmonella enteritidis* en muestras de productos avícolas de consumo humano en la Región Metropolitana. Disponible en:  
[http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S003498872000001000001&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S003498872000001000001&script=sci_arttext)
23. Rodríguez, R., Galeano, S., Herrera, I., Moreno, R., Garcia, O., Almaza, O. (1994). Salmonelosis en algunas granjas comerciales de postura en la sabana de Bogotá,. Disponible en:  
<http://www.iatreia.udea.edu.co/index.php/iatreia/article/viewFile/349/271>
24. Ruano (2009). Salmonelosis y su Impacto en la Avicultura Moderna. Department of Animal and Food Sciences. University of Delaware. Newark. Memorias del Congreso Nacional 2009. AMEVEA. Disponible en:  
<http://www.amevea-ecuador.org/datos/Salmonellosis%20en%20Avicultura.pdf>
25. Semanas Epidemiológicas 1 – 8. Del 1 de Enero al 25 de Febrero del (2012). Dirección Nacional De Vigilancia Epidemiológica. Disponible en: <http://issuu.com/mspecuador/docs/gaceta>
26. Tabares del Campo, Z.C. (2001). Intoxicaciones alimentarias en Antioquia. Rev. Epidemiol Antioquia. Disponible en:  
[http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S012108072011000200008&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S012108072011000200008&script=sci_arttext&tlng=pt)
27. UNAM (2011). Glosario, Departamento de Microbiología y Parasitología. Recuperado el 15 de julio de 2012. Disponible en:  
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/glosario.html>
28. USDA (2012). Información sobre Inocuidad de Alimentos. Fechas en Productos de Alimentos. Servicio de Inocuidad e Inspección de los Alimentos. Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Recuperado en julio 2011. Disponible en:  
[www.fsis.usda.gov/PDF/Spanish\\_Panic\\_Button.pdf](http://www.fsis.usda.gov/PDF/Spanish_Panic_Button.pdf).



## LISTADO DE ABREVIATURAS

**AGROCALIDAD.** Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro.

**AMEVEA.** Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Avicultura del Ecuador.

**AMPc.** Adenosín Monofosfato Cíclico

**API 20E.** Índice Analítico de Perfil (del inglés, Analytical Profile Index) con un conjunto de 20 pruebas bioquímicas para identificación de Enterobacterias.

**Aw.** Actividad de agua.

**BAM US.** Manual Analítico Bacteriológico del Departamento de Administración de Drogas y Alimentos (FAO) (del inglés, Department of Drug Administration Bacteriology Analytical Manual).

**BPA.** Buenas Prácticas Avícolas.

**BPM** Buenas Prácticas de Manufactura.

**CDC.** Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (EE.UU).

**CMFPM.** Coordinación de Mercados, Ferias y Plataformas Municipales.

**CONAVE.** Corporación Nacional de Avicultores del Ecuador.

**DMQ.** Distrito Metropolitano de Quito.

**ECDC.** Centro Europeo para la Prevención y Control de Enfermedades (del inglés, European Centre for Disease Prevention and Control).

**EFSA.** Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.

**ELISA.** Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (del inglés, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

**EPI 1.** Instrumento del sistema de información de vigilancia

epidemiológica que recolecta datos de 31 enfermedades de alto potencial epidémico de reporte obligatorio semanal (diagnósticos presuntivos, probables y confirmados); 7 síndromes, brotes y epidemia; muerte materna; desastres y accidentes colectivos y otras emergencias sanitarias.

**EPI 2.** Instrumento del Sistema Integrado de Vigilancia Epidemiológica (SIVE) que recolecta datos confirmados de enfermedades de notificación obligatoria mensual y otros eventos sujetos a vigilancia epidemiológica.

**ETAs.** Enfermedades Transmitidas por Alimentos

**ETEC.** *Escherichia coli* enterotoxigénica

**FAO.** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (del inglés, Food and Agriculture Organization).

**FDA.** Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos de América (del inglés, Food and Drug Administration).

**FSIS.** Servicio de Inocuidad e Inspección de los Alimentos (FSIS) de EEUU (del inglés Food Safety and Inspection Service).

**IMS.** Separación Inmuno Magnética.

**INEN.** Instituto Ecuatoriano de Normalización.

**MAGAP.** Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca.

**MSP.** Ministerio de Salud Pública.

**MSRV.** Medio Semisólido Rappaport Vassiliadis.

**NASBA.** Amplificación Isotérmica de Ácidos Nucleicos (del inglés, Nucleic Acid Sequence Based Amplification)

**NCBI.** Centro Nacional para la Información Biotecnológica (del inglés, National Center for Biotechnology Information).

**OIE.** Organización Mundial de Sanidad Animal (del inglés, World

Organization for Animal Health).

**OMS.** Organización Mundial de la Salud

**OPS.** Organización Panamericana de la Salud

**PANAFTOSA.** Centro Pan-Americano de Fiebre Aftosa.

**PCR.** Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés, Polymerase Chain Reaction).

**SIM.** Sulfato-Indol-Movilidad.

**SIRVETA.** Sistema Regional de Información para la Vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por Alimentos

**SIVE.** Sistema Integrado de Vigilancia Exterior.

**SSA.** Salmonella Shigella Agar

**TSA.** Agar Trypticase de Soya.

**TSI.** Hierro Triple Azúcar

**USDA US.** Departamento de agricultura de los Estados Unidos (del inglés, Department of Agriculture of United States).

**XLD.** Xilosa, Lisina, Desoxicolato.

## GLOSARIO

**Aw (Actividad de agua).** Relación entre la presión de vapor de un alimento en relación con la presión de vapor del agua pura a la misma temperatura. Es un parámetro estrechamente ligado a la humedad del alimento lo que permite determinar su capacidad de conservación, de propagación microbiana, etc.

**Bacteriófago** (Abr. fago). Virus que infecta bacterias. Formas modificadas de fagos se utilizan como vectores de clonación (FAO, 2004).

**Bioseguridad.** conjunto de prácticas de manejo orientadas a prevenir el contacto de las aves con microorganismos patógenos (CONAVE, 2006).

**Brotes.** La aparición de dos o más casos de la misma enfermedad asociados en tiempo, lugar y persona (Ibáñez C, 2007).

**Clado.** Grupo monofilético de organismos, es decir, incluye al ancestro común más reciente y a sus descendientes (UNAM, 2011).

**Cepa.** Grupo de individuos derivados por ascendencia de un único individuo dentro de una especie. (FAO, 2004).

**Colonia.** Grupo de organismos unicelulares que viven en asociación, a menudo derivado de una sola célula. (UNAM, 2011)

**Codex Alimentarius.** Es el Código de los Alimentos. Posee una base científica, la correcta aplicación de sus normas de producción, procesamiento, empaque y traslado, garantiza la inocuidad en los alimentos (Lanza O, 2003).

**Crioconservación.** Conservación del germoplasma en estado latente mediante su almacenamiento a muy bajas temperaturas, normalmente sumergido en nitrógeno líquido. Actualmente se aplica para el almacenaje de semillas y polen de plantas, microorganismos, esperma animal, y líneas celulares de cultivo de tejidos. Sinónimos: crioconservación, conservación por congelación (FAO, 2004).

**Dendograma.** es un tipo de representación gráfica o diagrama de datos en forma de árbol (Dendro=árbol) que organiza los datos en subcategorías que se van dividiendo en otros hasta llegar al nivel de detalle deseado (asemejándose a las ramas de un árbol que se van dividiendo en otras sucesivamente). Este tipo de representación permite apreciar claramente las relaciones de agrupación entre los datos e incluso entre grupos de ellos aunque no las relaciones de similaridad o cercanía entre categorías.

**Endotoxina.** Endotoxinas bacterianas - Lipopolisacáridos complejos que se localiza en la membrana externa de la pared celular de bacterias gram negativas, liberadas cuando la bacteria se lisa o durante su crecimiento. Están compuestas por tres fracciones: el lípido A, un polisacárido central y antígenos O (UNAM, 2011).

**Epidemiología.** Es el estudio de las epidemias es decir, de las enfermedades que afectan transitoriamente a muchas personas o animales en un sitio determinado (Merino T, 2007).

**Especie.** Categoría de los seres vivos del rango inferior al género. Se compone de individuos con estructura y composición química similar y pueden ser distinguidos de individuos pertenecientes a otras especies. Desde el punto de vista estrictamente de la taxonomía, es la jerarquía comprendida entre el género (o el subgénero) y la variedad (o la subespecie) (UNAM, 2011).

**Especificidad.** Parámetro de validez de una prueba. Capacidad para identificar correctamente a quienes no tienen la enfermedad que se pretende diagnosticar o descartar. Si la prueba da un resultado negativo y la enfermedad está ausente, se habla de "negativo verdadero". Cuando el resultado es negativo, pero la enfermedad está presente, se hace referencia a un "falso negativo" (UNAM, 2011).

**Espora.** Estructura producida por algunos hongos, protozoos y bacterias. Ciertas bacterias producen esporas como mecanismo de defensa, con

paredes gruesas y resistencia a temperaturas altas, humedad y a otras condiciones desfavorables (UNAM, 2011).

**Fermentación.** Degradación anaeróbica microbiana de sustancias orgánicas complejas, sobre todo carbohidratos, con liberación de energía. Se suele emplear de forma incorrecta para referirse a cultivos aeróbicos celulares practicados a gran escala en aparatos especializados (fermentadores, biorreactores) para la síntesis de productos secundarios (FAO, 2004).

**Filogenia.** Relaciones evolutivas entre organismos (FAO, 2004).

**Genómica.** Estrategia de investigación que, a partir de la caracterización molecular y de la clonación de genomas completos, estudia la estructura, el funcionamiento y los cambios evolutivos del material genético para poder dar respuesta a preguntas biológicas fundamentales (FAO, 2004).

**Gram (tinción).** Técnica basada en la propiedad de la pared celular bacteriana de retener o no el colorante de Gram y que permite dividir a las bacterias en dos grandes grupos. Las bacterias Gram positivas se tiñen de color púrpura oscuro, mientras que las Gram negativas sólo adquieren una débil tonalidad rojiza. La estructura de la pared celular es la propiedad que determina la retención del colorante (FAO, 2004).

**Incubación.** Acción de empollar los huevos aplicando calor de forma natural o artificial. 2. Período entre infección y presentación de los síntomas inducidos por un patógeno. 3. Cultivo de células y organismos (FAO, 2004).

**Infectividad** - Expresa la habilidad de un organismo para entrar, sobrevivir y multiplicarse en el hospedero (UNAM, 2011).

**Inocuo (alimento).** Ausencia de contaminantes, adulterantes, toxinas y cualquier otra sustancia que pueda ser nocivo para la salud, o bien unos niveles inocuos o aceptables de los mismos. Además de la inocuidad, las características de calidad incluyen el valor nutricional y las propiedades

organolépticas y funcionales (Código Alimentario Argentino, 2010).

**Lipopolisacárido** (Abr. LPS). Compuesto que consta de un lípido unido a un polisacárido; con frecuencia un componente de las paredes de las células microbianas (FAO, 2004).

**Medio diferencial.** Medio utilizado para diferenciar tipos de microorganismos, basándose en sus colores, formas de colonias. Ej: agar Macconkey's y agar SS (UNAM, 2011).

**Medio selectivo.** Medios de cultivo que contienen sustancias inhibitorias o factores únicos de crecimiento para un organismo o un grupo de ellos. Permiten seleccionar los organismos elegidos (UNAM, 2011).

**Mesófilo.** Microorganismo capaz de crecer a temperaturas entre 20 °C y 50 °C; el crecimiento óptimo suele producirse alrededor de los 37 °C (FAO, 2004).

**Nosocomial (infección).** Infección contraída en el hospital por un paciente internado debido a una razón distinta a esa infección. ó una infección que se presenta en un paciente internado en un hospital o en otro establecimiento de atención de la salud en quien la infección no se había manifestado ni estaba en período de incubación en el momento del ingreso. Incluye también las enfermedades que se manifiestan después del alta hospitalaria y las infecciones ocupacionales del personal del establecimiento (UNAM, 2011).

**Ovoproducto.-** Son productos alimenticios constituidos principalmente por la totalidad o una parte del contenido del huevo, eventualmente desprovisto de alguno de sus componentes naturales, o al que se le han añadido algunos ingredientes y finalmente comercializado en forma refrigerada, congelada o desecada, sometido a veces a un tratamiento de saneamiento por pasteurización o irradiación (INEN, 2011).

**Patogenicidad:** Se refiere a los mecanismos de infección y desarrollo de la enfermedad; la virulencia es la medida (grado) de patogenicidad (Uribarren T, 2004).

**Portador asintomático.** Individuo infectado por un organismo que causa enfermedad y no presenta signos ni síntomas por un periodo de tiempo prolongado (UNAM, 2011).

**Serología.** Estudio de las reacciones del suero entre un antígeno y su anticuerpo. Se utiliza principalmente para identificar y distinguir entre antígenos, tales como los específicos para determinados microorganismos y virus (FAO, 2004).

**Virulencia.** El grado de patogenicidad de un agente infeccioso. Implica invasión y toxigenicidad (UNAM, 2011).

**Zoonosis.** Infección o enfermedad de animales vertebrados, que se transmite, bajo condiciones naturales, al hombre (CONAVE, 2006).